

Pilotstudie zur Expressionsanalyse
der Monocarboxylattransporter 1 und 4 bei kaninen oralen
Plattenepithelkarzinomen und deren Verwendung zur Erstellung
einer Hypoxie-Kartographie

von Elisabeth Monika Gabriele Wucher

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Pilotstudie zur Expressionsanalyse
der Monocarboxylattransporter 1 und 4 bei kaninen oralen
Plattenepithelkarzinomen und deren Verwendung zur Erstellung
einer Hypoxie-Kartographie

von Elisabeth Monika Gabriele Wucher

aus Freising

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Mitbetreuung durch: Dr. Melanie Wergin, PhD Radioonkologie

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Walter Herrmanns

Tag der Promotion: 6. Februar 2016

Meiner Familie

in Liebe und Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	10
II.	LITERATURÜBERSICHT	13
1.	Tumorhypoxie.....	13
1.1.	Grundlagen der Tumorhypoxie	13
1.2.	Pathophysiologie der Tumorhypoxie	13
1.2.1.	Zelluläre Adaptation an hypoxische Bedingungen	14
1.2.2.	Molekulare Adaptation an hypoxische Bedingungen	15
1.3.	Einteilung der Hypoxie	16
1.3.1.	Chronische Hypoxie	16
1.3.2.	Zyklische Hypoxie	17
1.4.	Biologisches Verhalten von Tumoren unter Hypoxie.....	18
1.4.1.	Chemosensitivität unter Tumorhypoxie	18
1.4.2.	Radiosensitivität unter Tumorhypoxie	19
2.	Monocarboxylattransporter	20
2.1.	Die Monocarboxylattransporter-Familie.....	20
2.2.	Kinetik der Monocarboxylattransporter	21
2.3.	Die Monocarboxylattransporter 1 und 4	22
2.3.1.	Expression	22
2.3.2.	Regulation	23
2.3.3.	Das Chaperon CD147/Basigin	24
2.3.4.	Monocarboxylattransporter und Tumoren	24
3.	Kanine orale Plattenepithelkarzinome.....	26
3.1.	Epidemiologie	26
3.2.	Klinik und biologisches Verhalten	26
3.3.	Diagnostik	27
3.4.	Therapie.....	27
III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Histologisches Probenmaterial.....	29
2.	Immunhistochemische Untersuchungen	29
2.1.	Verwendete Antikörper	29
2.2.	Vorbereitungen für die Immunhistochemie (IHC).....	30

2.2.1.	Verwendete Lösungen.....	30
2.2.2.	Paraffinextraktion und Rehydrierung.....	31
2.2.3.	Etablierung der Protokolle zum einzelnen und simultanen immunhistochemischen Nachweis von MCT1 und MCT4.....	31
2.3.	Immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin	32
2.4.	Immunhistochemische Darstellung MCT1 und MCT4.....	33
2.4.1.	Immunhistochemischer Einzelnachweis von MCT1 und MCT4.....	33
2.4.2.	Simultane immunhistochemische Detektion von MCT1 und MCT4.....	33
2.5.	Immunhistochemische Darstellung des Von Willebrand Faktor	34
3.	Auswertung	35
3.1.	Quantitative morphologische Analysen	35
3.1.1.	Flächenanteil des Tumorgewebes im Gewebeschnitt	38
3.1.2.	Flächenanteil der epithelialen Zellen im Tumorgewebeanschnitt.....	38
3.1.3.	Flächenanteile von MCT1-, MCT4- und immunhistochemisch MCT1- und MCT4-doppelt-positiver Zellen im Tumorepithel	39
3.1.4.	Flächenanteil der Gefäße am Tumorgewebeanschnitt	39
3.2.	Berechnung der Flächenanteile	40
4.	Verwendete Materialien	41
4.1.	Geräte	41
4.2.	Material	42
4.3.	Reagenzien	43
IV.	ERGEBNISSE	45
1.	Histopathologische Befunde	45
2.	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen.....	45
2.1.	Flächenanteil des Tumors am Gewebeschnitt.....	45
2.2.	Zytokeratin-Immunoreaktivität	46
2.2.1.	Qualitative Auswertung.....	46
2.2.2.	Quantitativ-morphologische Auswertung	47
2.3.	MCT1 und MCT4-Immunoreaktivität	48
2.3.1.	Qualitative Auswertung.....	48
2.3.2.	Quantitativ-morphologische Auswertung	52
2.4.	Von Willebrand Faktor-Immunoreaktivität	53
2.4.1.	Qualitative Auswertung.....	53

2.4.2.	Quantitativ-morphologische Auswertung	54
V.	DISKUSSION	56
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	62
VII.	SUMMARY.....	64
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	66
IX.	ANHANG	88
1.	HE-Färbung.....	88
2.	IHC Zytokeratin.....	89
3.	IHC MCT1/4.....	91
3.1.	Protokoll Einzel-IHC zum Nachweis von MCT1 oder MCT4	91
3.2.	Protokoll Doppel-IHC zum Nachweis von MCT1 und MCT4	92
4.	IHC von Willebrand Faktor.....	94
X.	DANKSAGUNG	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$A_{A(X/Y)}$	Flächendichte der Struktur X im Referenzcompartment Y
AP-1	Aktivator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
CAIX	Carboanhydrase 9
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Erythropoietin
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
GLUT-1	Glukosetransporter 1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia-inducible Factor 1
HRE	Hypoxie Responsive Elemente
IHC	Immunhistochemie
MCT	Monocarboxylattransporter

MVD	Gefäßdichte (Microvessel Density)
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PFI	Progressionsfreies Intervall
pH	potentia Hydrogenii
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
$P_{P(X/Y)}$	Punktedichte der Struktur X im Referenzcompartment Y
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RT	Raumtemperatur
VEGF	Endothelwachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

I. EINLEITUNG

Tumorhypoxie stellt ein in der Human- und Veterinärmedizin weit verbreitetes Forschungsgebiet dar. Sie repräsentiert einen häufigen Grund für Therapieversagen und besitzt darüber hinaus auch prognostische Relevanz (HOCKEL et al., 1996; NORDSMARK et al., 2005; MARTINIVE et al., 2006). Es werden zwei verschiedene Formen von Tumorhypoxie unterschieden: akute (synonym „zyklische“, „intermittierende“ oder „transiente“) und chronische Hypoxie. Beide haben ihren Ursprung in einer ineffizienten Vaskularisierung des Tumors. Zellen, die in größerer Entfernung von den Blutgefäßen liegen, sind von permanenter Sauerstoffunterversorgung betroffen. Chronische Hypoxie tritt häufig auf, wenn eine ungenügende Vaskularisierung zu einer Unterversorgung des Tumorgewebes führt. Zyklische Hypoxie hingegen erklärt sich durch eine eingeschränkte Perfusion, die auf eine vaskuläre Stase (REINHOLD et al., 1977) und Instabilitäten im Erythrozytenfluss zurückzuführen ist (DEWHIRST et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress aufgrund von akuter Hypoxie zu einer anderen zellulären Reaktion führt als solcher aufgrund von chronischer Hypoxie (REYNOLDS et al., 1996; YUAN et al., 2004; CARDENAS-NAVIA et al., 2008).

Eine wichtige physiologische Anpassungsreaktion stellt die Fähigkeit dar, unter hypoxischen Bedingungen ATP durch Glykolyse aus Glukose zu generieren (WU & RACKER, 1959). Um die Redox-Homöostase aufrechtzuerhalten, wird die Energiegewinnung hypoxischer Zellen von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse umgestellt. Dabei entsteht Pyruvat, welches unter anaeroben Bedingungen in Laktat umgewandelt wird (WU & RACKER, 1959; DANG & SEMENZA, 1999).

Sonveaux et al. (SONVEAUX et al., 2008) zeigten, dass möglicherweise eine Symbiose zwischen hypoxischen und aeroben Tumorzellen besteht: Oxygenierte Zellen sind in der Lage, Laktat zur Energiegewinnung zu nutzen. Dies ermöglicht, dass Glukose in weiter entfernte hypoxische Tumorregionen diffundieren und dort zur ATP-Produktion genutzt werden kann, während Laktat von den hypoxischen Tumorzellen entlang eines Diffusionsgradienten in oxygenierte Bereiche diffundiert und dort als Energielieferant dienen kann. Der passive Transport in die

und aus der Zelle wird durch protonengebundene Monocarboxylattransporter (MCTs) vermittelt (HALESTRAP & PRICE, 1999; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

MCT1 ist ein ubiquitär exprimierter transmembranärer Transporter für kurzkettige Monocarboxylate. Er ist je nach vorhandenen Bedingungen in der Lage, Laktat sowohl in die Zelle ein-, als auch aus der Zelle herauszuschleusen und übernimmt durch den Symport von Protonen auch eine wichtige Rolle in der Regulierung des intrazellulären pH-Wertes (DUBOCHAUD et al., 2000; HALESTRAP & MEREDITH, 2004; ULLAH et al., 2006). MCT4 regelt den Export von Laktat aus glykolytischen Zellen (DIMMER et al., 2000) und kommt vor allem in Geweben mit hauptsächlich glykolytischer Energiegewinnung vor.

Mithilfe immunhistochemischer Darstellung ist es gelungen, MCT1 und MCT4 in verschiedenen humanen Tumoren zu detektieren. Eine Studie konnte die Expression von MCT1 in kaninen oralen Melanomen nachweisen (SHIMOYAMA et al., 2007). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem immunhistochemischen Nachweis von MCT1 und MCT4 in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen.

Plattenepithelkarzinome stellen nach malignen Melanomen die zweithäufigsten oralen Tumoren beim Hund dar (KOSOVSKY et al., 1991; BRONDEN et al., 2009). Sie zeigen sich oft als proliferative bis ulzerierende Umfangsvermehrung, häufig auch mit Knochenbeteiligung. Therapie und Prognose hängen von der histologischen Diagnose ab. Man unterscheidet zwei Formen der oralen Plattenepithelkarzinome: die tonsilläre und nicht-tonsilläre. Die tonsillären Plattenepithelkarzinome werden als sehr aggressiv mit hoher Metastasierungsrate und häufigem Auftreten von Rezidiven nach Therapie beschrieben (BROOKS et al., 1988). Nicht-tonsilläre Plattenepithelkarzinome weisen eine geringere Metastasierungsneigung auf und lokale Tumorkontrolle stellt aus therapeutischer Sicht die wichtigste Maßnahme dar (CANDACE K. GRIER, 2007).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Expressionsmuster von MCT1 und MCT4 in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen zu charakterisieren. Hierzu wurden die Protokolle zum immunhistochemischen Nachweis von MCT1 und MCT4 in Schnittpräparaten formalinfixierter, paraffineingebetteter kaniner Gewebeproben etabliert. Das mögliche Vorliegen einer Koexpression von MCT1

und MCT4 in identischen Tumorzellen, welches als Anzeichen für das Vorliegen zyklischer Hypoxie erachtet wird (WERGIN et al., 2015) wurde mithilfe einer simultanen immunhistochemischen Darstellung von MCT1 und MCT4 (sogenannte „Doppelfärbung“) untersucht. Das Ausmaß der immunhistochemisch nachgewiesenen MCT1- und/oder MCT4-Expression in Präparaten von 40 kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen wurde durch quantitativ morphologische Analysen ermittelt. Da momentan keine endogenen Marker zur Unterscheidung von chronischer und zyklischer Hypoxie zur Verfügung stehen, stellt die vorliegende Arbeit die Grundlage für weitere Forschungen zur sogenannten Tumor-Hypoxie-Kartographie dar.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Tumorhypoxie

Hypoxie – Griechisch ὑπό (hyp-) „unter, unterhalb“ und ὀξύς (oxy-) „sauer, scharf“ (Oxygenium = Sauerstoff), Unterversorgung mit Sauerstoff – ist ein weit verbreitetes Forschungsgebiet der experimentellen und klinischen Onkologie und stellt ein Charakteristikum der Pathophysiologie bei soliden Tumoren dar. Ihr kommt eine entscheidende Rolle bei vielen physiologischen Vorgängen wie Zellproliferation, Angiogenese, Zellmetabolismus und Immunreaktivität, aber auch Tumordinvasion und Metastasierung zu (RUAN et al., 2009). Durch eine erhöhte Metastasierungsneigung und Resistenzen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie kann Hypoxie zu einer Verschlechterung der Prognose führen (TEICHER, 1994; HOCKEL et al., 1996; NORDSMARK et al., 2005).

1.1. Grundlagen der Tumorhypoxie

Zur Quantifizierung der Gewebeoxygenierung wird gewöhnlich der Sauerstoffpartialdruck pO_2 verwendet. Dieser liegt in den meisten Körpergeweben in einem Normbereich von etwa 40 mmHg (BERTOUT et al., 2008). Im Allgemeinen wird bei einem Sauerstoffpartialdruck von < 10 mmHg von Hypoxie gesprochen (SEMENZA, 2003; JORDAN & SONVEAUX, 2012).

Je nachdem, ob die niedrige Gewebeoxygenierung aufgrund von unzureichender Vaskularisierung oder einer mangelhaften Perfusion zustande kommt, unterscheidet man zwei Formen von Hypoxie: die diffusionsabhängige chronische Hypoxie und die perfusionsabhängige zyklische Hypoxie (HOCKEL & VAUPEL, 2001).

Hypoxie zählt zu den charakteristischen Merkmalen von soliden Tumoren („hallmarks of cancer“) und ist an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt.

1.2. Pathophysiologie der Tumorhypoxie

Der Tumormetabolismus wird über verschiedene pathophysiologische Mechanismen beeinflusst, sowohl über zelluläre, als auch molekulare Adaptationen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Entstehung von

sogenannten Reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS). ROS werden in aeroben Organismen vorwiegend in den Mitochondrien im Rahmen des physiologischen Zellstoffwechsels als Nebenprodukte gebildet (BENHAR et al., 2002). Diese aggressiven Sauerstoffradikale übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose (KAMATA & HIRATA, 1999; STORZ, 2005). Ihre Entstehung korreliert mit der normalen Zellproliferation durch Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden (LAURENT et al., 2005). Zellulärer Stress, wie beispielsweise Hypoxie und Reoxygenierung, kann eine erhöhte Konzentration von ROS bewirken. Diese können pathologische Mechanismen hervorrufen, wie beispielsweise die konstante Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) und AP-1 (Aktivator Protein 1). Es ist bekannt, dass ROS auch bei der Karzinogenese, Tumorprogression und Therapieresistenz eine wichtige Rolle spielen (STORZ, 2005; FRUEHAUF & MEYSKENS, 2007; KONDOH et al., 2013; ZHANG et al., 2015). ROS können zum Beispiel den Abbau der HIF (Hypoxia-inducible-factor)-1 α -Untereinheit verhindern. Dadurch kommt es zur Stabilisierung von HIF-1. Über diesen Mechanismus beeinflussen ROS auch HIF-Zielgene (KLIMOVA & CHANDEL, 2008) (siehe auch unter 1.2.2.).

1.2.1. Zelluläre Adaptation an hypoxische Bedingungen

Tumorzellen können sich an Sauerstoffunterversorgung durch verschiedene Mechanismen wie Veränderungen des Zellzyklus, -metabolismus, inhibierte Proliferation und Apoptose anpassen (GRAEBER et al., 1996; VAUPEL & MAYER, 2007). Die zelluläre Adaption geschieht vor allem über eine Umstellung der Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse. Da unter hypoxischen Bedingungen der Zitratzyklus blockiert ist und Pyruvat nicht weiter verstoffwechselt werden kann, ist die Herstellung von ATP über die Atmungskette nicht mehr möglich. Durch Anwendung des Pasteur-Effektes sind Tumorzellen trotzdem in der Lage, Energie zu produzieren, wenn auch mit einer deutlich ungünstigeren Energiebilanz (WU & RACKER, 1959): Pyruvat wird dabei weiter zu Laktat abgebaut, wodurch zwei Moleküle ATP entstehen. Im Gegensatz dazu gehen aus der oxidativen Phosphorylierung 38 Moleküle ATP pro Molekül Glukose hervor (DANG & SEMENZA, 1999). Hypoxische Tumorzellen benötigen folglich deutlich mehr Glukose, um die Zellfunktionen aufrechtzuerhalten. Um die Energieversorgung unter Sauerstoffmangel

sicherzustellen, werden vermehrt Glucosetransporter (GLUT-1) exprimiert (GATENBY et al., 2007). Durch die anaerobe Glykolyse entsteht mehr Laktat, dieses führt zu einer Ansäuerung des Tumor-Mikromilieus.

Warburg (WARBURG, 1926) fand heraus, dass Tumorzellen außerdem die Fähigkeit besitzen, Glykolyse unter normoxischen Bedingungen zur Energiegewinnung heranzuziehen. Diese aerobe Glykolyse wird von einigen Tumoren genutzt, sie scheint eine wichtige Rolle im Tumorwachstum zu spielen (MARIN-HERNANDEZ et al., 2006; GILLIES et al., 2008).

Neben Änderungen des Energiestoffwechsels sind auch vermehrte Angiogenese und eine Inhibition der Apoptose wesentliche Anpassungsmechanismen (HARRIS, 2002), welche zu einem Wachstumsvorteil unter hypoxischen Bedingungen und somit autarkem Tumorwachstum führen (GATENBY et al., 2007). Auch auf molekularer Ebene führt Hypoxie zu einer Adaptation, wie beispielsweise die vermehrte Produktion und Sekretion von Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen.

1.2.2. Molekulare Adaptation an hypoxische Bedingungen

Durch Aktivierung einer molekularen Signalkaskade im Tumor selbst und dem umgebenden Gewebe kommt es infolge vermehrter oder inhibierter Transkription unterschiedlicher Gene zu einer Modifikation des zellulären Proteoms.

Eine zentrale Rolle unter den molekularen Adaptationen nimmt dabei der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxia-inducible-factor-1) ein (WANG & SEMENZA, 1993). Durch eine Veränderung der Genexpression durch HIF-1 kommt es unter anderem zu einer Induktion der Angiogenese und zu einer Anpassung des Energiestoffwechsels (MAXWELL et al., 1997). In zahlreichen human- und veterinärmedizinischen Studien konnte eine Korrelation zwischen der vermehrten Expression von HIF-1 in Tumoren und der Malignität von Tumoren nachgewiesen werden (ZHONG et al., 1999; KAMBAYASHI et al., 2015; SHIN et al., 2015). HIF-1 besteht aus den zwei Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Die Expression von HIF-1 β ist unabhängig von der Oxygenierung der Zelle. Im Gegensatz dazu verfügt HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen nur über eine sehr kurze Halbwertszeit, da es nach der Hydroxylierung durch Bindung an das Tumor-Suppressor-Protein von Hippel-Lindau (pVHL) für den zügigen Abbau markiert wird (KAELIN & RATCLIFFE, 2008). Unter hypoxischen Bedingungen

kommt es wegen mangelnder Hydroxylierung zu einer Stabilisierung von HIF-1 α , was zu einer erhöhten Konzentration von HIF-1 α führt und die Bindung an die Untereinheit HIF-1 β ermöglicht. Das gebildete Heterodimer HIF-1 fungiert als Transkriptionsfaktor, der dann an die Hypoxie responsiven Elemente (HREs) der HIF-1- Zielgene bindet (SEMENZA et al., 1996).

HIF-1 bewirkt durch die Bindung an die HREs eine erhöhte Expression von über 100 Genen (KE & COSTA, 2006). Über eine gesteigerte Expression des Vascular endothelial growth factor (VEGF) (FORSYTHE et al., 1996; JUBB et al., 2004) und Erythropoietin (SEMENZA et al., 1991; WANG & SEMENZA, 1993) wird beispielsweise die Angiogenese beziehungsweise die Erythropoese gefördert. Über eine vermehrte Synthese des Transferrinrezeptors wird die Aufnahme und der Transport von Eisen in die Zelle erhöht (TACCHINI et al., 1999). Durch die Hochregulation des Enzyms Pyruvatdehydrogenase Kinase1 wird der Eintritt von Pyruvat in den Zitratzyklus gehemmt und Pyruvat vermehrt in Laktat umgewandelt, um für die Glykolyse zur Verfügung zu stehen (KIM et al., 2006; PAPANDREOU et al., 2006). HIF-1 erleichtert über eine vermehrte Expression von Glukose-Transportern, wie zum Beispiel GLUT-1 (CHEN et al., 2001), die Glukoseaufnahme in die Zellen und trägt über die Stimulierung von Carboanhydrase 9 (CA IX) zur pH-Wert-Regulierung bei (LONCASTER et al., 2001). Auch der Monocarboxylattransporter 4 wird über den Einfluss von HIF-1 vermehrt exprimiert (ULLAH et al., 2006).

Das Tumorsuppressorgen p53 ist für die Kontrolle der Zellproliferation zuständig. Es ist in nicht-neoplastischen Zellen beim Auftreten von starker Hypoxie für die Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) zuständig (GRAEBER et al., 1996). Die Mutation von p53 ist bei Tumorzellen häufig und führt dazu, dass entartete oder durch Hypoxie geschädigte Zellen nicht in die Apoptose gehen sondern trotz fehlerhafter DNS proliferieren (HOLLSTEIN et al., 1994).

1.3. Einteilung der Hypoxie

Es werden zwei Formen von Hypoxie unterschieden: die diffusionsabhängige chronische Hypoxie und die perfusionsabhängige zyklische Hypoxie (HOCKEL & VAUPEL, 2001).

1.3.1. Chronische Hypoxie

Chronische Hypoxie beschreibt eine verminderte Sauerstoffkonzentration

aufgrund einer ungenügenden Sauerstoffdiffusion.

Wachsen Tumoren über eine Größe von etwa drei Millimeter hinaus, ist die Blutgefäßversorgung des umgebenden Gewebes nicht mehr ausreichend. Sauerstoff verfügt über eine eingeschränkte Diffusionsstrecke von circa 100 bis 180 μm (THOMLINSON & GRAY, 1955; FOLKMAN, 1971; BERTOUT et al., 2008). Vergrößert sich die Entfernung der Kapillaren zu dem zu oxygenierenden Gewebe, tritt eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit ein.

Durch die Ausschüttung proangiogenetischer Faktoren regen wachsende Tumoren die Gefäßneubildung an (FOLKMAN, 1971). Die entstandenen Blutgefäße sind allerdings vor allem bei malignen Tumoren häufig nicht physiologisch ausgebildet und können die Versorgung des wachsenden Tumors nur unzureichend übernehmen (VAUPEL et al., 1989). Die Anordnung der Gefäße ist ungleichmäßig und zeigt eine abnormale, chaotische Architektur mit Verlust der Gefäßhierarchie. Teilweise enden die neu gebildeten Blutgefäße auch blind, bilden arterio-venöse Shunts aus oder zeigen eine übermäßige Permeabilität (KONERDING et al., 1989a, 1989b; VAUPEL et al., 2001; NISHIDA et al., 2006). Eine physiologische und effiziente Oxygenierung innerhalb des größer werdenden Tumors ist deshalb trotz Neoangiogenese oft nicht gegeben (THEWS et al., 2004).

Neben der defizitären Gefäßversorgung kann auch eine Anämie, welche bei Tumorpatienten häufig auftritt, zu chronischer Hypoxie führen. Dabei ist unerheblich, ob die Anämie tumorassoziiert oder therapiebedingt ist.

1.3.2. Zyklische Hypoxie

Im Gegensatz zur chronischen Hypoxie beschreibt die zyklische, auch transiente, intermittierende oder akute Hypoxie eine vorübergehend niedrige Sauerstoffkonzentration des Tumorgewebes.

Diese temporäre Änderung der Gewebeerxygenierung kann durch eine Perfusionsstörung zustande kommen. Die partielle oder vollständige Unterbrechung des Blutflusses kann zu akuter Hypoxie führen (REINHOLD et al., 1977; CHAPLIN et al., 1987). Sie kann durch unterschiedliche Mechanismen entstehen. Sowohl ein Kollaps der Gefäße durch hohen interstitiellen Druck innerhalb des Tumorgewebes, als auch eine Verlegung des Gefäßlumens durch Leukozyten oder durch Einwachsen von Tumorzellen können ursächlich für eine

vaskuläre Stase sein (JORDAN & SONVEAUX, 2012). Diese führt aber im Gegensatz zu früheren Annahmen (TROTTER et al., 1991; DURAND & LEPARD, 1995) nicht alleine zu akuter Hypoxie. Kimura et al. (KIMURA et al., 1996) konnten zeigen, dass es in der Tumervaskulatur zu einer Fluktuation im Erythrozytenfluss kommt, wodurch Schwankungen in der Sauerstoffversorgung auftreten. Diese sind häufig zyklisch im Abstand von Minuten bis Stunden (BRISTOW & HILL, 2008; BAYER & VAUPEL, 2012).

Der Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe unterliegt ständigen Schwankungen (CARDENAS-NAVIA et al., 2008). Mit jedem Hypoxiezyklus steigt die Anzahl von Mutationen in Tumorzellen (REYNOLDS et al., 1996). Graeber et al. (GRAEBER et al., 1996) fanden heraus, dass zyklisch hypoxische Zellen mit mutiertem Tumor-Suppressorgen p53 einen Selektionsvorteil haben und somit dem Zelltod (Apoptose) entgehen können. Zyklische Hypoxie führt außerdem zu Tumorprogression und Therapieresistenz (MARTINIVE et al., 2006) sowie zu vermehrter Metastasierung (CAIRNS et al., 2001; CAIRNS & HILL, 2004).

1.4. Biologisches Verhalten von Tumoren unter Hypoxie

Eine Reihe von human- und veterinärmedizinischen Studien wies eine Korrelation zwischen Tumorphypoxie und gesteigerter Malignität nach (TEICHER, 1994; HOCKEL et al., 1996; SEMENZA, 2000; NELSON et al., 2004; SNYDER et al., 2008; ROHRER BLEY et al., 2009). So zeigen Tumoren unter hypoxischen Bedingungen häufig ein aggressiveres biologisches Verhalten, eine höhere Metastasierungsneigung und eine Progression unter Therapie, welche auf eine Therapieresistenz hindeutet (SEМЕНZA, 2000; VAUPEL, 2004).

1.4.1. Chemosensitivität unter Tumorphypoxie

Für Chemotherapie ist eine ausreichende Oxygenierung des Tumors von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg. Tumorzellen sind in der Lage, unter oxidativem Stress den Zellzyklus anzuhalten (HARRIS, 2002). Wird unter mangelnder Sauerstoffzufuhr die Zellteilung teilweise oder vollkommen gestoppt, bleibt die durchgeführte Therapie weniger effektiv beziehungsweise wirkungslos. Für manche Chemotherapeutika wie Platinderivate, bestimmte Alkylanzien und Antibiotika besteht eine direkte Sauerstoffabhängigkeit bezüglich ihrer Wirksamkeit (VAUPEL, 1997). In einer Studie von Teicher et al. (TEICHER et al., 1981) konnte in vitro nachgewiesen werden, dass eine verminderte

Zellteilungsrate unter hypoxischen Bedingungen Tumorzellen weniger angreifbar durch Zytostatika macht, da Zytostatika überwiegend sich schnellteilende Zellen schädigen. Diese Tumorzellen haben einen Selektionsvorteil durch eine entwickelte Resistenz.

Auch verminderte Perfusion und ineffektive Vaskularisierung kann die Chemosensitivität unter hypoxischen Gegebenheiten reduzieren, indem der Wirkstofftransport eingeschränkt ist (FOLKMAN, 1971).

1.4.2. Radiosensitivität unter Tumorphypoxie

Auch die Radiosensitivität von Tumoren ist durch Hypoxie beeinflusst. Die Wirkkraft der Strahlentherapie basiert auf dem Vorhandensein von Sauerstoff (HALL, 2006). Ionisierende Strahlung setzt im Gewebe aggressive reaktive Radikale frei. Diese schädigen die DNS über Einzel- und Doppelstrangbrüche, welche zunächst reversibel sind. Bei Vorhandensein von Sauerstoff kann der DNA-Schaden über Oxidierung stabilisiert und infolgedessen die Apoptose eingeleitet werden (BROWN & WILSON, 2004). Der Sauerstoffpartialdruck ist somit sehr bedeutsam für den Therapieerfolg (GATENBY et al., 1988). Auch die Reoxygenierung durch die Fraktionierung der Strahlendosis hat entscheidenden Einfluss auf die Effektivität der Therapie (KOCHER & TREUER, 1995).

Um den gleichen biologischen Effekt ionisierender Strahlung zu erhalten wie unter normoxischen Bedingungen benötigt man beim Vorliegen von Hypoxie etwa eine dreimal höhere Strahlendosis (GRAY et al., 1953).

In zahlreichen human- und veterinärmedizinischen Studien wurde gezeigt, dass Hypoxie die Radiosensitivität reduziert und als negativer prognostischer Faktor gilt. Sie bedingt eine höhere Metastasierungsneigung und eine Verkürzung der progressionsfreien Zeit (HOCKEL et al., 1996; RUDAT et al., 2001; NORDSMARK et al., 2005; ROHRER BLEY et al., 2009). Hsieh et al. (HSIEH et al., 2010) stellten die Hypothese auf, dass akute Hypoxie durch eine langdauernde Aktivierung von HIF-1 zu ausgeprägter Radioresistenz bei humanen Gliomzellen führt als chronische Hypoxie.

2. Monocarboxylattransporter

2.1. Die Monocarboxylattransporter-Familie

Monocarboxylattransporter (MCTs) sind integrale Membranproteine, welche den Transport von Monocarboxylaten wie Laktat, Pyruvat und Ketonkörper katalysieren. Der zügige In- und Export dieser Substrate spielt eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Fettstoffwechsel (POOLE & HALESTRAP, 1993; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

Die Monocarboxylattransporter gehören der SLC16 Gen Familie an (SLC steht für solute carrier). Bisher sind 14 Mitglieder bekannt, welche charakteristische Sequenzfolgen gemeinsam haben. Alle sind aus zwölf transmembranären Anteilen (transmembrane helices, TMs) mit intrazellulären Carboxy- und Amino-Termini aufgebaut (siehe Abbildung 1:).

Zwischen den Isoformen bestehen Sequenzvariationen in der C-terminalen Domäne und der großen zytosolischen Schleife (HALESTRAP & MEREDITH, 2004; MEREDITH & CHRISTIAN, 2008).

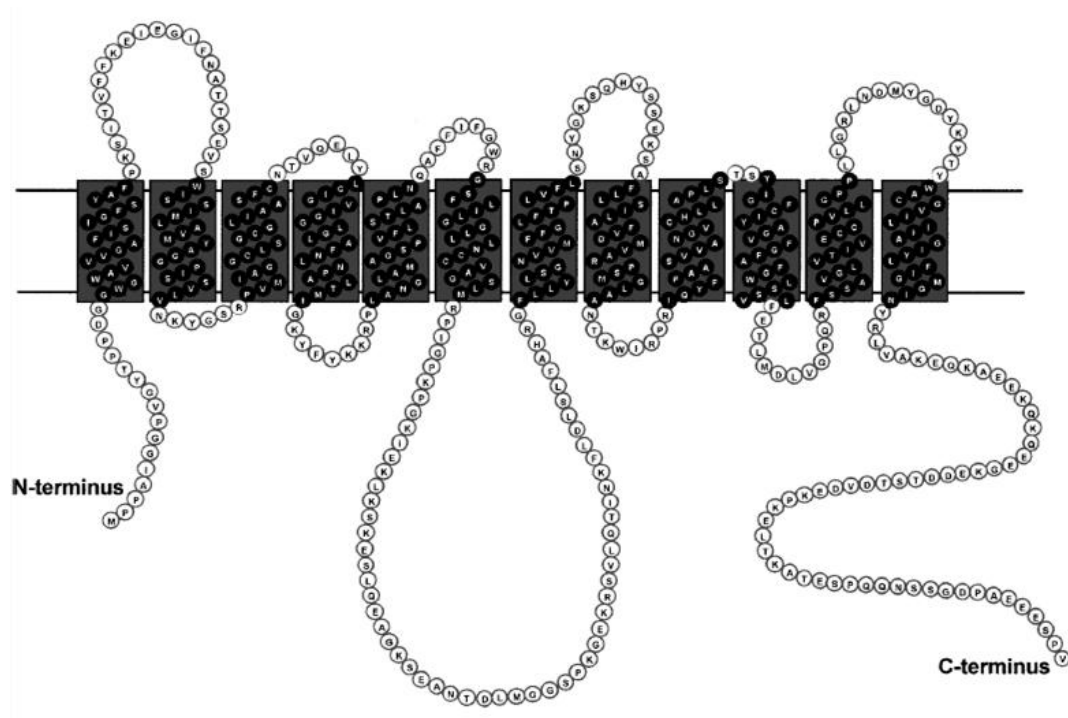


Abbildung 1: Vorgeschlagene Membran-Topologie der MCT-Familie. Aus Halestrap und Price (HALESTRAP & PRICE, 1999).

Bislang ist die Funktion von sechs MCTs bekannt (HALESTRAP & WILSON, 2012). MCT1 wird fast ubiquitär in allen Geweben exprimiert und ist in Abhängigkeit der Stoffwechsellaage für den zellulären In- und Efflux von Laktat, aber auch anderen Monocarboxylaten zuständig. In Herz- und Skelettmuskulatur regelt MCT1 den Import von Laktat und Ketonkörpern in die Myozyten (BONEN, 2001). Auch ermöglicht MCT1 (und MCT2) die Aufnahme dieser Substrate in die Neurone über die Blut-Hirn-Schranke (PIERRE & PELLERIN, 2005). MCT2 ist vornehmlich in Neuronen, Leber und Niere exprimiert und fungiert dort als Laktattransporter. MCT3 übernimmt diese Funktion ausschließlich in der Retina. Wie MCT1 kommt MCT4 in vielen Geweben vor, welche von Energiegewinnung über Glykolyse abhängig sind (siehe Tabelle 1). MCT4 ist für den Export von Laktat zuständig. MCT8 übernimmt Transportfunktion für die Schilddrüsenhormone T4 und T3 und ist ebenso weit verbreitet (FRIESEMA et al., 2003). In Geweben ohne MCT8-Expriemierung kann MCT10 diese Funktion übernehmen. Es wird angenommen, dass MCT10 in Niere, Darm und Leber auch für die effiziente Absorption von Aminosäuren zuständig ist (FRIESEMA et al., 2003).

Tabelle 2: Expression von MCT1 und MCT4 im Gewebe. Modifiziert nach Kennedy und Dewhirst (KENNEDY & DEWHIRST, 2010)

	Verteilung im Gewebe	Hohe Expression
MCT1	ubiquitär	Herz, Skelettmuskel (aerob)
MCT4	Skelettmuskel, Lunge, Hoden, Herz, Placenta, Haut, Retina, Gehirn Chondrozyten, Leukozyten	Skelettmuskel (glykolytisch), Astrozyten, Leukozyten

2.2. Kinetik der Monocarboxylattransporter

Deuticke (DEUTICKE, 1989) stellte fest, dass Laktat und Pyruvat immer nach dem gleichen Prinzip transportiert werden: entweder im Symport mit einem Proton oder im Austausch gegen ein anderes Monocarboxylat. Bei MCT1 – 4 ist ein protonengebundener Transportmechanismus nachgewiesen. Dieser funktioniert über eine erleichterte Diffusion: über einen äquimolaren Symport mit

Protonen folgen die Substrate ohne Energieaufwand dem Konzentrationsgradienten (ENERSON & DREWES, 2003). Dabei bindet zunächst das Proton an den Monocarboxylattransporter, anschließend das Laktat-Anion. Nach einer Konformationsänderung des MCTs translozieren beide Substrate und werden auf der anderen Seite der Zellmembran freigesetzt. Der Prozess ist abgeschlossen, wenn der Monocarboxylattransporter wieder auf die andere Seite der Membran zurückgekehrt ist. Dieser letzte Schritt kann unterschiedlich lange dauern und scheint der zeitgebende Faktor zu sein (HALESTRAP & PRICE, 1999).

2.3. Die Monocarboxylattransporter 1 und 4

Als wichtige Laktat-Transporter nehmen die Monocarboxylattransporter 1 und 4 eine Schlüsselfunktion im Tumorstoffwechsel ein. Das intrazellulär anfallende Laktat wird aus den Zellen geschleust und kann unter normoxischen Bedingungen zur aeroben Energiegewinnung wieder aufgenommen werden (SONVEAUX et al., 2008). Durch den Symport von Protonen haben MCT1 und MCT4 auch eine entscheidende Rolle in der intrazellulären pH-Regulierung (DUBOUCAUD et al., 2000; HALESTRAP & MEREDITH, 2004; ULLAH et al., 2006).

Es wird vermutet, dass das Hilfsprotein Basigin (auch bekannt als CD147) ein essentielles Chaperon für MCT1 und MCT4 ist und eine wichtige Rolle beim Erreichen der Plasmamembran spielt (KIRK et al., 2000). Gallagher et al. (GALLAGHER et al., 2009) konnten eine direkte Korrelation von MCT1 und MCT4 mit CD147 nachweisen.

2.3.1. Expression

Die Expression von MCT1 und MCT4 wurde bereits in einer Vielzahl verschiedener Tumorarten bei Mensch und Tier beschrieben (GALLAGHER et al., 2007; SHIMOYAMA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2008b; KIM et al., 2015). Die Expression ist über verschiedene Mechanismen geregelt, von denen bislang noch nicht alle bekannt sind.

Während MCT1 annähernd ubiquitär vorhanden ist, wird MCT4 insbesondere in Geweben exprimiert, die ihre Energie überwiegend über Glykolyse beziehen, wie beispielsweise weiße Muskelfasern, Astrozyten, Leukozyten und Chondrozyten (DIMMER et al., 2000). Kinetisch ist MCT4 auf den Export von Laktat aus glykolytischen Zellen angepasst. Obwohl MCT4 über eine geringe Affinität für L-

Laktat ($K_m = 22 \text{ mM}$) verfügt, stellt die noch geringere Affinität für Pyruvat ($K_m = 150 \text{ mM}$) sicher, dass nicht das überlebensnotwendige Pyruvat aus den Zellen exportiert wird. MCT1 zeigt für L-Laktat eine mittlere Affinität ($K_m = 4 - 7 \text{ mM}$). Seine Hauptaufgabe besteht darin, abhängig von der Stoffwechsellage den Im- und Export von Laktat zu ermöglichen. MCT1 transportiert aber auch andere kurzkettige Monokarboxylate, zum Beispiel Propionat, Butyrat und Pyruvat (HALESTRAP & WILSON, 2012).

2.3.2. Regulation

Für die Regulation von MCT1 scheint Laktat eine wichtige Bedeutung zu haben. In der Sportphysiologie ist der Laktattransport durch MCT1 in der Muskulatur ein bedeutendes Forschungsthema. Garcia et al. (GARCIA et al., 1994) konnten 1994 als Erste die Molekül-Struktur des von ihnen als Monocarboxylattransporter 1 bezeichneten Proteins klären. Die Expression von MCT1 korreliert mit der Anzahl von Typ-1 Muskelfasern (PILEGAARD et al., 1999), während MCT4 überwiegend in Typ-2 Muskelfasern vorkommt (WILSON et al., 1998; PILEGAARD et al., 1999). Durch Training (BAKER et al., 1998) oder chronische Stimulation der Muskulatur mit Niederfrequenzstrom (MCCULLAGH et al., 1996) kommt es zu vermehrtem Anfall von Laktat und es erfolgt eine Hochregulation von MCT1. Wird Muskulatur nicht belastet, führt dies zu einer Reduktion des Laktattransportes und einer verminderten Expression von MCT1 (DUBOCHAUD et al., 1996; MCCULLAGH et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Laktat selbst zu einer erhöhten Expression von MCT1 führt (HASHIMOTO et al., 2007). Auf die Expression von MCT4 hat Laktat im Gegensatz dazu keinen Einfluss (HASHIMOTO et al., 2007).

Neben Laktat konnten noch weitere Substrate identifiziert werden, die zu einer Hochregulierung von MCT1 führen. Borthakur et al. (BORTHAKUR et al., 2008) konnten zeigen, dass durch Butyrat, eine kurzkettige Fettsäure, die im Kolon aus der bakteriellen Fermentation entsteht, eine Stimulation der MCT1-Promoteraktivität erfolgt. Auch Hormone haben eine regulierende Wirkung. Sowohl das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) (FANELLI et al., 2003), als auch Testosteron (ENOKI et al., 2006) führen zu einer vermehrten Expression von MCT1 im Gewebe.

Hypoxie spielt bei der Regulation von MCT4 eine entscheidende Rolle. Wie

zuvor beschrieben, kommt es unter hypoxischen Bedingungen zu einer Stabilisierung von HIF-1 α und damit zu einer intrazellulären Kumulation, wodurch sich die beiden Untereinheiten zu dem Komplex HIF-1 verbinden. HIF-1 führt zu einer Expressionssteigerung von MCT4, indem es an die Hypoxie-sensiblen Elemente dessen Promoters bindet (ULLAH et al., 2006). Bei MCT1 konnten im Gegensatz dazu keine HRE-Promoter gefunden werden, wodurch erklärt werden könnte, warum Hypoxie keine Expressionssteigerung von MCT1 herbeiführt (ULLAH et al., 2006).

2.3.3. Das Chaperon CD147/Basigin

Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion von MCT1 und MCT4 abhängig ist von der Interaktion mit anderen Proteinen wie beispielsweise dem Protein CD147/Basigin. Verschiedene Studien zeigten eine Koexpression von MCT1 und MCT4 mit CD147 (KIRK et al., 2000; GALLAGHER et al., 2007; KIM et al., 2015). Gallagher et al. (GALLAGHER et al., 2007) zeigten in Silencing-Versuchen, dass sowohl die Expression von MCT1 und MCT4 durch eine Stilllegung von Basigin vollständig eingestellt wurde, als auch die Expression von Basigin durch Stilllegung von MCT1 und MCT4 vermindert wurde. In einem Experiment von Baba et al. (BABA et al., 2008) mit humanen Tumorzelllinien führte der gegen CD147 gerichtete Antikörper MEM-M6/1 zu einer Hemmung der Assoziation zwischen MCT1 und Basigin an der Zelloberfläche. Infolgedessen kam es zu einer Reduktion der Laktataufnahme und -freisetzung sowie einer Absenkung des intrazellulären pH-Wertes, was letztendlich den Zelltod zur Folge hatte.

2.3.4. Monocarboxylattransporter und Tumoren

Die Expression von Monocarboxylattransportern wurde bereits in verschiedenen humanmedizinischen Tumoren nachgewiesen, beispielsweise in Zervixkarzinomen (PINHEIRO et al., 2008a), Mammakarzinomen (ASADA et al., 2003; GALLAGHER et al., 2007), kolorektalen Tumoren (PINHEIRO et al., 2008b), Prostatakarzinomen (ANDERSEN et al., 2015), Gliomen (MATHUPALA et al., 2004), Oesophagustumoren, Ovarialtumoren (YAN et al., 2015), Neuroblastomen (FANG et al., 2006), Pankreastumoren (BAEK et al., 2014), Lungentumoren (LADANYI et al., 2002; MEIJER et al., 2012), Nierentumoren (FISEL et al., 2015; KIM et al., 2015), Harnblasentumoren (CHOI

et al., 2014; SHI et al., 2015), Kopf- und Halstumoren (CURRY et al., 2013), Multiplen Myelomen (HANSON et al., 2015), Melanomen (HO et al., 2012), Lebertumoren (ALVES et al., 2014) und Osteosarkomen (ZHAO et al., 2014). Tiermedizinisch ist bisher die Expression von MCT1 in kaninen oralen und okulären Melanomen nachgewiesen worden (SHIMOYAMA et al., 2007).

Die entscheidende Rolle der Monocarboxylattransporter ist durch die Tatsache begründet, dass der Transport von Laktat im Tumorstoffwechsel essentiell ist. Wu und Racker (WU & RACKER, 1959) zeigten, dass Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen den Pasteur-Effekt nutzen und ihre Energie über anaerobe Glykolyse beziehen. Außerdem sind sie in der Lage, auch über die von Warburg (WARBURG et al., 1927) entdeckte aerobe Glykolyse Energie zu gewinnen. Dies verschafft Tumorzellen einen Selektionsvorteil gegenüber normalen Zellen. Durch den hohen Anfall von Laktat intrazellulär und den dadurch bedingten protonengebundenen Export über MCT4 entsteht ein saures extrazelluläres Milieu, welches bei normalen Zellen zum Zelltod führt (GATENBY et al., 2007).

Sonveaux et al. (SONVEAUX et al., 2008) konnten eine Symbiose zwischen hypoxischen und normoxischen Gebieten im Tumor feststellen. Das bei hypoxischen Zellen in der Glykolyse anfallende Laktat wird über MCT4 aus der Zelle ausgeschleust und diffundiert in oxygenierte Bereiche. Dort kann es über MCT1 in die normoxischen Zellen aufgenommen und der oxidativen Phosphorylierung zugeführt werden. So bleibt den hypoxischen Tumorzellen mehr Glukose zur Energiegewinnung.

In verschiedenen humanmedizinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von MCT1 und MCT4 mit einer ungünstigen Prognose korreliert. So zeigten Baek et al. (BAEK et al., 2014) in einer Zellkulturstudie über Pankreastumoren, dass die Inhibition von MCT4 das Tumorwachstum unterdrückt und die Anfälligkeit für metabolischen Stress erhöht. Pertega-Gomes et al. (PERTEGA-GOMES et al., 2011) zeigten die Relevanz von MCT4 als prognostischen Marker bei Prostatakarzinomen, Nakayama et al. (NAKAYAMA et al., 2012) wiesen eine Korrelation von MCT4 zwischen aggressivem Verhalten und Tumorprogression bei kolorektalen Tumoren nach. Auch MCT1 liefert Hinweise auf die Prognose und das Therapieansprechen, wie Studien über nicht-kleinzellige Lungentumoren (GUO et al., 2015), Ovarialtumoren (YAN et al.,

2015) und kolorektale Tumoren (FEI et al., 2015) zeigen. Kim et al. (KIM et al., 2015) konnten eine Korrelation der Expression von MCT1, MCT4 und CD147 mit Tumorprogression beim Nierenzellkarzinom nachweisen. Morais-Santos et al. (MORAIS-SANTOS et al., 2015) zeigten im Mausmodell eine Wachstumshemmung von Mammakarzinomen nach Knockout von MCT1 und MCT4.

Der Einfluss von Monocarboxylattransportern auf das Verhalten und die Progression von Tumoren macht sie zu einem wichtigen Forschungsgebiet mit dem Ziel einer spezifischen chemotherapeutischen Hemmung (MATHUPALA et al., 2004; FANG et al., 2006; SONVEAUX et al., 2012; AMORIM et al., 2015; GURRAPU et al., 2015; HANSON et al., 2015).

3. Kanine orale Plattenepithelkarzinome

Plattenepithelkarzinome sind häufig auftretende Tumoren der Maulhöhle beim Hund. Sie lassen sich nach ihrer Lokalisation unterscheiden in nicht-tonsillär und tonsillär, wobei auch das biologische Verhalten beider Typen variiert.

3.1. Epidemiologie

Orale Tumoren machen 6-7 % aller kaninen Neoplasien aus und sind damit die vierthäufigste Krebserkrankung beim Hund (HOYT & WITHROW, 1984). Plattenepithelkarzinome stellen nach dem oralen Melanom den zweithäufigsten malignen Tumor im Maul- und Rachenraum beim Hund dar. Am häufigsten treten orale Plattenepithelkarzinome im Bereich der Mandibel und im rostralen Bereich der Prämolaren auf, Gaumen und bukkale bzw. labiale Mukosa sind weniger oft betroffen (TODOROFF & BRODEY, 1979). Hunde mittelgroßer und großer Rassen scheinen prädisponiert zu sein (DORN & PRIESTER, 1976; KESSLER & KÜHNEL, 2011). In einer Studie schienen Rüden ein höheres Risiko zu haben, einen oropharyngealen Tumor zu entwickeln (DORN et al., 1968a; DORN et al., 1968b).

3.2. Klinik und biologisches Verhalten

Plattenepithelkarzinome erscheinen meist proliferativ bis ulzerierend und zeigen nicht selten ein aggressives Wachstum mit Knocheninvasion. Bei Tumoren im kaudalen Pharynx können Gesichtsdeformation, Schmerzen beim Öffnen des Maules, verminderter Appetit (Hyporexie), Schluckstörungen (Dysphagie),

Mundgeruch (Halitosis), übermäßiger Speichelfluss und gelegentlich auch Lymphadenopathie noch vor einer sichtbaren Masse als primäres Symptom auftreten (KOSOVSKY et al., 1991; WALLACE et al., 1992). Die Metastasierungswahrscheinlichkeit gilt im Allgemeinen als gering und hängt von der Lokalisation des Tumors ab, bei nicht-tonsillären Plattenepithelkarzinomen beträgt sie bis zu 10 % (THEON et al., 1997). Die Streuung erfolgt meist im späteren Krankheitsverlauf (VOS & VAN DER GAAG, 1987), am häufigsten sind die regionären Lymphknoten (Lymphonodi mandibulares) betroffen, die Lunge ist in 3 bis 36 % beteiligt (THEON et al., 1997). Bei tonsillären Plattenepithelkarzinomen wird von einer deutlich schlechteren Prognose ausgegangen (MURPHY et al., 2006). Dies liegt zum einen daran, dass die Diagnose häufig erst sehr spät gestellt wird, zum anderen an der deutlich höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit von bis zu 73 % (BROOKS et al., 1988). Für die nicht-tonsillären Tumoren ist die Prognose gut (FULTON et al., 2013). Lokale Kontrolle stellt aus therapeutischer Sicht die wichtigste Maßnahme dar.

3.3. Diagnostik

Orale Tumoren zeigen sich oft ulzerierend und enthalten entzündliche und nekrotische Bereiche, was die Diagnose erschweren kann. Obwohl die Diagnostizierbarkeit mittels Feinnadelaspiration und zytologischer Untersuchung gute Ergebnisse für orale Plattenepithelkarzinome liefert (GHISLENI et al., 2006), ist eine histologische Untersuchung anzuraten. Hierfür sollte eine möglichst große Gewebeprobe einschließlich gesunden Gewebeanteils reseziert werden. Bei kleineren Läsionen kann versucht werden, diese komplett über eine Exzisionsbiopsie zu entfernen. Für die Wahl der Therapie ist neben einer gesicherten histologischen Diagnose ein komplettes Tumorstaging entscheidend (CANDACE K. GRIER, 2007).

3.4. Therapie

Die lokale Kontrolle des Tumors ist das wichtigste Ziel therapeutischer Interventionen. Diese kann durch Chirurgie, Strahlentherapie oder eine Kombination der beiden erreicht werden. In einer Studie konnten auch sehr gute Ergebnisse mit photodynamischer Therapie gezeigt werden (MCCAW et al., 2000).

Operative Entfernung ist die häufigste Behandlungsmethode von oralen

Plattenepithelkarzinomen. Je weiter rostral gelegen der Tumor ist, desto wahrscheinlicher ist eine komplette Resektion. Bei konservativer Abtragung ist mit einem früheren Rezidiv zu rechnen (TODOROFF & BRODEY, 1979), wohingegen mit einer Kieferresektion eine günstigere Prognose einhergeht. In einer Studie mit 26 Hunden, die eine partielle Mandibulektomie erhalten hatten, zeigten 91 % eine Überlebensrate von über einem Jahr (KOSOVSKY et al., 1991). Von 7 Hunden, die mit einer Hemimaxillektomie therapiert wurden, überlebten 57 % länger als ein Jahr (WALLACE et al., 1992).

Auch kurative Strahlentherapie ist eine erfolgreiche Methode, orale Plattenepithelkarzinome lokal zu kontrollieren (LADUE-MILLER et al., 1996; THEON et al., 1997). In einer Studie von Théon et al. (THEON et al., 1997) ergab sich eine progressionsfreie Überlebenszeit von 36 Monaten, wobei 72 % der Hunde länger als ein Jahr lebten. Je kleiner der Tumor war, desto besser war der Therapieerfolg.

Photodynamische Therapie führte in einer Studie bei 8 von 11 Hunden mit Plattenepithelkarzinomen bis zu einer Größe von 1 cm Durchmesser zu einer Rezidivfreiheit von über 17 Monaten (MCCAW et al., 2000).

Es ist nicht bekannt, inwieweit Chemotherapie das Metastasierungsrisiko von oralen Plattenepithelkarzinomen reduzieren kann. Eine Studie mit 5 Hunden mit tonsillärem Plattenepithelkarzinom zeigte, dass chirurgische Zytoreduktion, Bestrahlung und anschließende Chemotherapie mit Carboplatin zu einer mittleren Überlebenszeit von 211 Tagen führte (MURPHY et al., 2006). Da orale Plattenepithelkarzinome das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) exprimieren (PESTILI DE ALMEIDA et al., 2001), gibt es Studien über den therapeutischen Einsatz des COX-2-Hemmers Piroxicam. Schmidt et al. (SCHMIDT et al., 2001) beschreiben eine Remissionsrate von 17 %. Eine Kombination mit Carbo- oder Cisplatin zeigte einen besseren Therapieerfolg, fünf von neun Hunden zeigten eine Tumorremission (BORIA et al., 2004).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Histologisches Probenmaterial

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 40 in Paraffin eingebettete Proben oraler, nicht-tonsillärer Plattenepithelkarzinome von 40 verschiedenen Hunden untersucht (pro Fall lag ein Paraffinblock vor). Die Paraffinblöcke wurden retrospektiv aus den Archivbeständen der Fachpraxis für Tierpathologie Dr. W. v. Bomhard und Dr. S. Pfleghaar, München, akquiriert. Die Proben stammten von in einem Zeitraum von 2010 bis 2012 in der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München sowie in privaten Tierarztpraxen in Deutschland resezierten Maulhöhlentumoren.

Die Gewebeproben wurden in neutral gepufferter 4%iger Formaldehydlösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach Einbettung der Proben in Paraffin wurden von jedem Paraffinblock elf konsekutive Schnitte mit einer nominellen Schnittdicke von 4 µm angefertigt.

Für die histopathologische Beurteilung wurde jeweils der erste der elf Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Hämalaun gefärbt. Darauf folgten das Bläuen in Leitungswasser und die Gegenfärbung mit Eosin. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte mit Histokitt eingedeckt (Färbeprotokoll siehe Anhang).

2. Immunhistochemische Untersuchungen

Alle Herstellerangaben zu den verwendeten Geräten, Materialien und Reagenzien finden sich in den jeweiligen Tabellen unter Punkt 4.1., 4.2. beziehungsweise 4.3.

2.1. Verwendete Antikörper

Zur Ermittlung der Flächenanteile der epithelialen Tumoranteile in den Gewebeschnitten wurde das in den Schnitten vorhandene Epithelgewebe durch immunhistochemische Detektion von Zytokeratin dargestellt. Hierfür wurde ein muriner, gegen humanes Zytokeratin gerichteter monoklonaler Antikörper verwendet (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, Clones AE1/AE3, Dako

Denmark A/S, Glostrup, Dänemark).

Für die einzelne Darstellung von MCT1 oder MCT4 und für die simultane immunhistochemische Detektion beider Proteine wurden polyklonale, aus dem Kaninchen stammende Antikörper gegen humanes MCT1 beziehungsweise MCT4 verwendet (MCT1/MCT4 Polyclonal Rabbit Anti-Human, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA). Der humane Antikörper wurde verwendet, da eine Überprüfung ergab, dass eine 96%ige Homologie des humanen und kaninen MCT1 und MCT4 besteht.

Zusätzlich erfolgte die Ermittlung der Flächenanteile der Blutgefäß- und Kapillaranschnitte in den tumorösen Anteilen der Gewebeschnitte als Parameter für die Tumor-Vaskularisierung. Die immunhistochemische Darstellung des von Willebrand Faktors (vWF, Endothelmarker) erfolgte mit dem polyklonalen, aus Kaninchen stammenden Antikörper gegen humanen von Willebrand Faktor (Von Willebrand Factor Polyclonal Rabbit Anti-Human, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark).

Als Kontrollgewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden zusätzlich Schnitte (4 µm Schnittdicke) von in Paraffin eingebetteten Präparaten von Leber-, Maulschleimhaut- und Muskelbiopsien gesunder Hunde aus dem Archiv des Institutes für Tierpathologie der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München verwendet.

2.2. Vorbereitungen für die Immunhistochemie (IHC)

2.2.1. Verwendete Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

2,15 g Kaliumhydrogenphosphat + 7,4 g Di-Natriumhydrogenphosphat + 16 g Natriumchlorid auf 5 l Aqua destillata (Aqua dest.), je nach IHC-Protokoll mit Zusatz von 0,05 % Triton X

Citratpuffer pH 6,0:

9 ml Stamm-Lösung A (0,1 M Citronensäure (21,01 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$) in 1 l Aqua dest.) + 41 ml Stamm-Lösung B (0,1 M Natriumcitrat (29,41 g $C_6H_5O_7 \times 2 H_2O$) in 1 l Aqua dest.) + 450 ml Aqua dest.

2.2.2. Paraffinextraktion und Rehydrierung

Vor Durchführung des jeweiligen immunhistochemischen Protokolls wurden die Schnitte zur Extraktion des Paraffins dreimal in Folge für je 10 Minuten in Xylol verbracht. Die anschließende Rehydrierung erfolgte über eine absteigende Ethanolreihe: jeweils 5 Minuten: 2 x 100%igem, 2 x 96%igem und 1 x 70%igem Ethanol und 5 Minuten Aqua dest.

Zur Verhinderung eines Austrocknens der Gewebeschnitte während der Inkubation wurden alle Reaktionsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt.

2.2.3. Etablierung der Protokolle zum einzelnen und simultanen immunhistochemischen Nachweis von MCT1 und MCT4

Zur Etablierung von Protokollen für die immunhistochemische Detektion von MCT1 und MCT4 wurden Paraffinschnitte von Proben kaniner Maulschleimhaut, Leber und Skelettmuskulatur verwendet. Beide MCT-Antikörper wurden in identischen methodischen Protokollen getestet. Hierbei wurden unterschiedliche Methoden der Antigen-Demaskierung (ohne Demaskierung, Anwärmen der Schnitte im Brutschrank bei 37°C über 2 Stunden, hitzeinduzierte Demaskierung in Citratpuffer pH 6 über 20 Minuten in der Mikrowelle bei 700 Watt), unterschiedliche indirekte Detektionsmethoden (Avidin-Biotin-Komplex, ImmPRESSTM Polymersystem), verschiedene Primärantikörperkonzentrationen (1:100, 1:200, 1:300, 1:600) und unterschiedliche Primärantikörperinkubationszeiten getestet. Zur Beurteilung unspezifischer Markierungen und Hintergrundfärbungen wurde als Negativkontrolle stets ein Schnitt der identischen Tumorprobe mitgeführt, welcher anstelle des Primärantikörpers mit PBS mit 2 % fetalem Kälberserum inkubiert wurde.

Optimale Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von MCT1 und MCT4 wurden bei Verwendung des ImmPRESSTM Polymersystems ohne Antigen-Demaskierung und mit einer Verdünnung des antiMCT1-Primärantikörpers von 1:200, bzw. einer 1:300 Verdünnung des antiMCT4-Primärantikörpers erreicht.

Die ausreichende Spezifität beider Antikörper wurde in Vorversuchen (Immunfluoreszenzverfahren) von Wergin et al. (WERGIN et al., 2015) unter Verwendung des jeweiligen Kontrollpeptides (Monocarboxylate Transporter 1/4 Control Peptide, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA)

nachgewiesen.

Die etablierten Protokolle der immunhistochemischen MCT1- und MCT4-Nachweise sind eingehend in Kapitel 2.4. dargestellt.

2.3. Immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin

Für die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin wurde der Zytokeratin-Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt. Es wurde das ImPRESSTM Polymer-System genutzt und es erfolgte eine Antigendemaskierung durch Hitzebehandlung mit Citratpuffer pH 6. Bei jedem Ansatz wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten Paraffinschnitte von kaniner Maulschleimhaut. Als Negativkontrolle wurde in jedem Untersuchungsang ein zusätzlicher Schnitt des Tumorgewebes mitgeführt, der anstelle des Primärantikörpers mit PBS inkubiert wurde.

Nach der unter Punkt 2.2.2. beschriebenen Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten bei 800 Watt, dann für 20 Minuten bei 250 Watt in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6 demaskiert. Es folgte eine 20minütige Abkühlphase im Demaskierungspuffer und weiteres Kühlen bis auf Raumtemperatur in Aqua dest. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Methanol mit 1 % Wasserstoffperoxid belassen. Nach fünfminütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte über 20 Minuten mit Pferde-Normalserum (ImPRESSTM Horse Anti-Mouse REAGENT KIT, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA, USA) bei Raumtemperatur inkubiert, um nicht-spezifische Hintergrundmarkierungen zu blocken. Danach wurde der Primärantikörper Cytokeratin mouse anti-human in einer Verdünnung von 1:50 in PBS aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte nach einem Waschschrir (fünf Minuten in PBS) 30 Minuten lang mit dem Sekundärantikörper (ImPRESSTM Horse REAGENT KIT, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Sekundärantikörper folgte ein weiterer fünfminütiger PBS-Waschschrir. Danach wurden die Schnitte für fünf bis zehn Minuten unter dem Abzug mit Diaminobenzidin (DAB) Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten in Aqua dest. gegeben und 20 Sekunden in Hämalau gegengefärbt. Nach fünfminütigem Bläuen folgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (je drei Minuten: 1 x 70 %, 1 x 80 %, 1 x 90 %, 1 x 100 %).

2 x 96 %, 2 x 100 %) und Xylol (3 x je fünf Minuten) und das Aufbringen der Deckgläschen mit Histokitt.

2.4. Immunhistochemische Darstellung MCT1 und MCT4

Zur Darstellung von MCT1 und MCT4 wurde der MCT1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 und der MCT4-Antikörper 1:300 in PBS mit 2 % fetalem Kälberserum aufgetragen. Die Detektion positiver Immunoreaktivität erfolgte durch Einsatz des ImPRESS™ Polymer-Systems. Als Positivkontrolle wurden bei jedem Ansatz Schnitte kaniner Skelettmuskulatur mitgeführt. Als Negativkontrolle diente in jedem Untersuchungsgang ein zusätzlicher Schnitt des Tumorgewebes, bei dem anstelle des Primärantikörpers nur PBS mit 2% fetalem Kälberserum aufgetragen wurde.

Für die Waschschritte wurde PBS mit 0,05 % Triton X versetzt. Ein Waschschritt beinhaltete 3 x fünf Minuten Waschen mit PBS-Triton X (0,05 %).

2.4.1. Immunhistochemischer Einzelnachweis von MCT1 und MCT4

Die entparaffinierten Schnitte wurden gewaschen und nachfolgend für 30 Minuten in Methanol mit 30%igem Wasserstoffperoxid (Verhältnis 1:9) bei Raumtemperatur inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Schnitte mit Pferdenormalserum (ImPRESS™ Horse, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht und am nächsten Tag noch eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper Anti-Human-MCT1 oder -MCT4 inkubiert. Nach einem Waschschritt folgte der Auftrag des Sekundärantikörpers (ImPRESS™ Polyclonal Horse Anti-Rabbit REAGENT KIT, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA, USA). Dieser wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten belassen. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und über fünf bis zehn Minuten DAB aufgetragen, danach wurden sie mit Aqua dest. gespült. Nach Gegenfärbung für 20 Sekunden in Hämalun, fünfminütigem Bläuen unter laufendem Leitungswasser und Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Deckgläschen und Histokitt eingedeckt.

2.4.2. Simultane immunhistochemische Detektion von MCT1 und MCT4

Die Gewebeschnitte wurden unter Verwendung des Primärantikörpers Anti-

Human-MCT1 bis einschließlich der Inkubation mit DAB dem gleichen Ansatz wie unter Punkt 2.4.1. unterzogen. Nach einem Waschschrift wurden sie zweimal für zwei Minuten mit Linblock (Linaris, Dossenheim, Deutschland) behandelt, um den Antikörper des ersten Färbegangs, anti-MCT1, zu blockieren. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der zweite Primärantikörper, Anti-Human-MCT4, aufgetragen und über Nacht bei 4°C sowie am dritten Tag für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten belassen. Nach einem anschließenden Waschschrift erfolgte eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (ImPRESS™ Horse Anti-Rabbit). Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen und für fünf Minuten das Chromogen Histogreen (Linaris, Dossenheim, Deutschland) aufgetragen. Es folgten analog zum Einzelnachweis von MCT1/4 Waschen in Aqua dest., Gegenfärbung für 20 Sekunden in Hämalun, fünfminütiges Bläuen unter laufendem Leitungswasser und die Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe mit abschließendem Eindecken mit Deckgläschen und Histokitt.

2.5. Immunhistochemische Darstellung des Von Willebrand Faktor

Für die Darstellung des vWF als Marker endothelialer Zellen wurde der Antikörper gegen humanen vWF in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS verwendet. Auch hier wurde das ImPRESS™ Polymer-System genutzt und es wurden pro Ansatz jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten Paraffinschnitte von kaniner Maulschleimhaut. Als Negativkontrolle wurde in jedem Untersuchungsgang ein zusätzlicher Schnitt des Tumorgewebes mitgeführt, der anstelle des Primärantikörpers lediglich mit PBS inkubiert wurde.

Nach dem Entparaffinieren und dem Rehydrieren der Schnitte erfolgte eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Proteolyse mittels Proteinase K (Proteinase K Ready-to-use, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark). Anschließend wurden die Schitte 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen und für 30 Minuten in Methanol mit 3% Wasserstoffperoxid 30%ig bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe von 5 Minuten und eine 20minütige Inkubation mit dem Normalserum (ImPRESS™ Horse) bei Raumtemperatur. Danach wurde der Primärantikörper anti-vWF für die Inkubation über Nacht bei 4°C aufgetragen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und danach der Sekundäntikörper (ImPRESSTM Horse Anti-Rabbit) für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach weiteren drei Waschschritten in PBS von je fünf Minuten wurden die Schnitte fünf Minuten lang mit NovaRED (VECTOR NovaRED Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA, USA) inkubiert. Nach Abwaschen in Aqua dest. wurden die Schnitte 15 Sekunden in Hämalaun gegengefärbt. Nach fünfminütigem Bläuen folgte die Dehydrierung über die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol und die Eindeckung mit Deckgläschen und Histokitt.

3. Auswertung

3.1. Quantitative morphologische Analysen

Die Bestimmung der Flächenanteile des Tumorgewebes am Gewebeschnitt ($A_{A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})}$), der epithelialen Tumorzellen im Tumoranteil der Gewebeprobe ($A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$), der MCT1- oder MCT4-positiven Zellen im epithelialen Tumoranteil ($A_{A(\text{MCT1-positive Zellen/Tumorepithel})}$) beziehungsweise ($A_{A(\text{MCT4-positive Zellen/Tumorepithel})}$), der MCT1/4-doppelt-positiven Zellen im epithelialen Tumoranteil ($V_{V(\text{MCT1\&MCT4-positive Zellen/Tumorepithel})}$) und der Blutgefäße im Tumoranteil der Gewebeprobe ($A_{A(\text{Gefäße/Tumor})}$) erfolgte durch Anwendung des Punktezählverfahrens nach Weibel (WEIBEL, 1979).

Die notwendige Anzahl der zu zählenden Punkte wurde aus einem Nomogramm von Weibel (WEIBEL, 1979) ermittelt. Dazu wurde in einer Voruntersuchung der Anteil des zu untersuchenden Kompartiments in der Gewebeprobe geschätzt und ein zu erwartender Schätzfehler von 5 % der mittleren Flächendichte berücksichtigt. Die Analysen wurden mit einem Stereologie-System (VIS-Visiopharm Integrator System® Version 3.4.1.0 mit newCAST® Software, Visiopharm A/S, Hørsholm, Dänemark) am Mikroskop Olympus BX41 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) im Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Zu Beginn wurde die gesamte Fläche des auf einem Schnitt befindlichen Gewebes markiert und es erfolgte eine systematisch zufällige Testfeldauswahl. Die systematisch zufällig ausgewählten Testfelder wurden in 12,5facher Vergrößerung (Ermittlung des Tumoranteils im Gewebeschnitt, $A_{A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})}$), 40facher Vergrößerung (Darstellung von Zytokeratin, $A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$),

400facher Vergrößerung (Ermittlung der Flächenanteile von MCT1-, MCT4- und MCT1/MCT4-doppelt-positiven Zellen im epithelialen Tumoranteil, $A_{A(MCT1\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$, $A_{A(MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$ beziehungsweise $A_{A(MCT1\&MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) und 200facher Vergrößerung (Ermittlung des Flächenanteils der Blutgefäße und Kapillaren im Tumoranteil der Gewebeprobe, $A_{A(Gefäße/Tumor)}$) auf einen Monitor übertragen. Auf die Testfelder wurde ein Raster mit äquidistanten Punkten projiziert (siehe Abbildung 2). Diejenigen Punkte des Rasters, welche die jeweils untersuchte Struktur trafen (Gewebe, Tumorschnitte, Schnitte von Zellen mit positivem immunhistochemischem Signal, Blutgefäße), wurden als Treffer gezählt. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop Olympus BX41 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg).

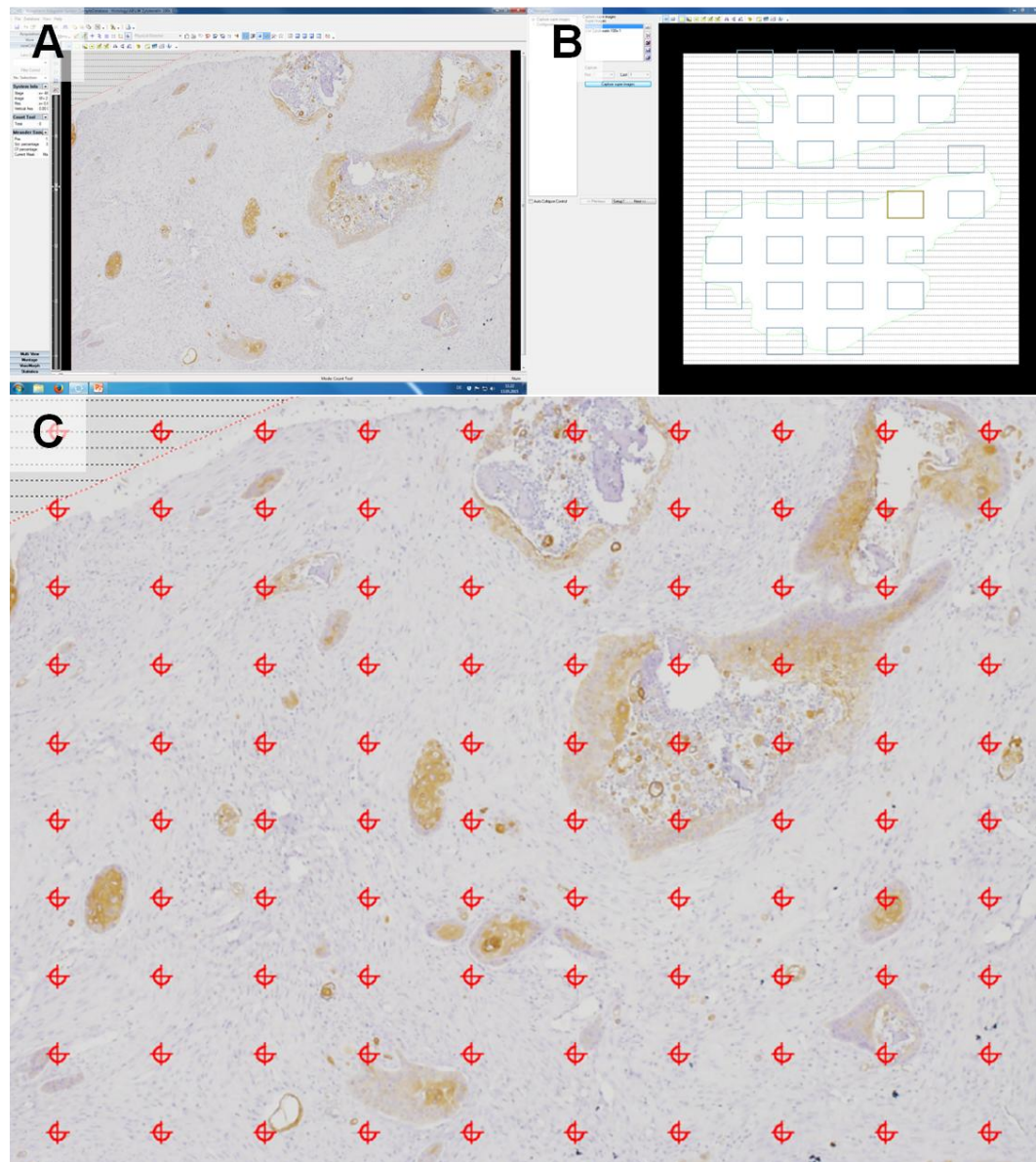


Abbildung 2: Ermittlung des Flächenanteils immunhistochemisch Zytokeratin-positiver epithelialer Tumorzellen in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen mithilfe des Stereologiesystems NEWCAST™ (Visiopharm, Hornsholm, Dänemark). **A:** Immunhistochemisches Schnittpräparat (Immunhistochemische Detektion von Zytokeratin) eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinoms. Die gesamte Anschnittsfläche des im Schnitt vorhandenen Gewebes wird markiert (Ausschnittsvergrößerung). **B:** Bei vorgegebener Vergrößerung erfolgt die systematisch zufällige Auswahl von Testfeldern innerhalb der gesamten Gewebeanschnittsfläche. Gezeigt ist der Umriss des im Schnitt befindlichen Gewebes sowie die Lokalisationen der systematisch zufällig ausgewählten Gesichtsfelder (sogenannter „super lens navigator modus“, 40fache Endvergrößerung). **C:** Ausschnittsvergrößerung aus A mit projiziertem Punkteraster (rote Kreuze). Punkte des Rasters, welche immunhistochemisch Zytokeratin-positive Tumorzellanschnitte treffen ($P_{(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen})}$), sowie alle Punkte, die auf Tumorgewebe treffen ($P_{(\text{Tumor})}$), werden gezählt. $A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$ wird als der Quotient der Summe sämtlicher, in allen ausgewerteten Testfeldern eines Falles auf Zytokeratin-positive Tumorzellanschnitte treffender Punkte und der Summe sämtlicher, in

allen ausgewerteten Testfeldern eines Falles auf Tumorgewebe treffender Punkte errechnet: $A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})} = P_{(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen})}/P_{(\text{Tumor})}$.

3.1.1. Flächenanteil des Tumorgewebes im Gewebeschnitt

Die Bestimmung des Flächenanteils des Tumorgewebes in den Gewebeschnitten ($A_{A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})}$) erfolgte an HE-gefärbten Schnittpräparaten. Die gesamte Gewebeanschnittsfläche (100 %) eines jeden Schnittes/Falles wurde in 1,25facher Objektivergrößerung und 10facher Okularvergrößerung beurteilt. Pro Fall wurden durchschnittlich $9,4 \pm 4,9$ systematisch zufällig ausgewählte Testfelder ausgewertet. Jedes Testfeld (Gesichtsfeld) wurde mit einem Punkteraster mit 36 äquidistanten Punkten überlagert. Es wurde die gesamte Anzahl der auf Gewebe treffenden Punkte ermittelt ($P_{(\text{Gewebeschnitt})}$), sowie die Anzahl der Punkte, welche auf Anschnittsflächen von neoplastischem Gewebe (Tumorepithel, -stroma, und nekrotische Areale) trafen ($P_{(\text{Tumorgewebe})}$). Pro Fall wurden durchschnittlich $172,1 \pm 121,5$ Trefferpunkte gezählt. Die Berechnung von $A_{A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})}$ erfolgte wie in Abschnitt 3.2. beschrieben.

3.1.2. Flächenanteil der epithelialen Zellen im Tumorgewebeanschnitt

Die Ermittlung des Flächenanteils epithelialer Tumorzellen in der Tumorschnittsfläche ($A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$) erfolgte an immunhistologischen Präparaten (Zytokeratin-Nachweis) bei 4facher Objektivergrößerung und 10facher Okularvergrößerung. Pro Fall wurden $20,7 \pm 8,6$ systematisch zufällig ausgewählte Testfelder, entsprechend einem Anteil der ausgewerteten Schnittfläche von 30 % der gesamten Tumorgewebeanschnittsfläche, ausgewertet. Jedes Testfeld (Gesichtsfeld) wurde mit einem Punkteraster mit 100 äquidistanten Punkten überlagert. Es wurde die gesamte Anzahl der in einem Fall auf immunhistochemisch Zytokeratin-positive Tumorepithelzellprofile treffenden Punkte ermittelt ($P_{(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen})}$), sowie die Anzahl der Punkte, welche auf Anschnittsflächen von neoplastischem Gewebe (Tumorepithel, -stroma, und nekrotische Areale) trafen ($P_{(\text{Tumorgewebe})}$). Pro Fall wurden durchschnittlich $530,9 \pm 330,8$ Trefferpunkte gezählt. Die Berechnung von $A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$ erfolgte wie in Abschnitt 3.2. beschrieben.

3.1.3. Flächenanteile von MCT1-, MCT4- und immunhistochemisch MCT1- und MCT4-doppelt-positiver Zellen im Tumorepithel

Die Bestimmung der jeweiligen Flächenanteile von MCT1-, MCT4- oder MCT1- und MCT4-doppelt-positiven Zellen im Tumorepithel ($A_{A(MCT1\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$), ($A_{A(MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) beziehungsweise ($V_{V(MCT1\&MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) erfolgte an immunhistologischen Präparaten (MCT1-, MCT4 und simultaner MCT1&MCT4-Nachweis). Pro Fall wurde die gesamte Anzahl derjenigen Punkte ermittelt, welche Anschnitte von Zellen trafen, die positive Immunoreaktivität gegen MCT1-, MCT4- oder beide MCT-Proteine zeigten. Die Auswertung erfolgte in der 400fachen Vergrößerung (40fache Objektivergrößerung und 10fache Okularvergrößerung). Pro Fall wurden durchschnittlich $23,2 \pm 4,4$ systematisch zufällig ausgewählte Testfelder, entsprechend einem Anteil der ausgewerteten Schnittfläche von 3 % der gesamten Tumorgewebeschnittfläche, ausgewertet. Jedes Testfeld (Gesichtsfeld) wurde mit einem Punkteraster mit 841 äquidistanten Punkten überlagert. Pro Fall wurden durchschnittlich $11349,9 \pm 3408,4$ Trefferpunkte ausgewertet. Die Berechnung der jeweiligen Flächenanteile ($A_{A(MCT1\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$), ($A_{A(MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) beziehungsweise ($V_{V(MCT1\&MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) erfolgte wie in Abschnitt 3.2. beschrieben.

3.1.4. Flächenanteil der Gefäße am Tumorgewebeanschnitt

Die Ermittlung des Flächenanteils der Blutgefäße im Tumorgewebe ($A_{A(Gefäße/Tumor)}$) erfolgte an immunhistologischen Präparaten (vWF-Nachweis) bei 20facher Objektivergrößerung und 10facher Okularvergrößerung. Pro Fall wurden $19,5 \pm 8,1$ systematisch zufällig ausgewählte Testfelder, entsprechend einem Anteil der ausgewerteten Schnittfläche von 3 % der gesamten Tumorgewebeschnittfläche, ausgewertet. Jedes Testfeld (Gesichtsfeld) wurde mit einem Punkteraster mit 900 äquidistanten Punkten überlagert. In allen ausgewerteten Testfeldern wurden die Tumorgewebsanschnitte treffenden Punkte gezählt ($P_{(Tumorgewebe)}$), sowie die Anzahl der Punkte, welche Gefäßanschnitte mit immunhistochemisch vWF-positiven Endothelzellanschnitten trafen (das heißt Punkte, welche Anschnitte von Gefäßlumina trafen, wurde mitgezählt). Pro Gewebeprobe wurden durchschnittlich $8987,6 \pm 9511,5$ Trefferpunkte gezählt. Die Berechnung von $A_{A(Gefäße/Tumor)}$ erfolgte wie in Abschnitt 3.2. beschrieben.

3.2. Berechnung der Flächenanteile

Die Flächendichten der verschiedenen Kompartimente (Tumorgewebe, Epithel, MCT1-, MCT4-, und MCT1/MCT4-doppelt-positive Zellen) an ihren entsprechenden Referenzkompartimenten (Gewebe, Tumor, Tumorepithel) wurden nach dem Prinzip von Delesse (ROYET, 1991) wie folgt errechnet:

$$A_A = P_P$$

$A_{A(X/Y)}$: Flächendichte einer Struktur X im Referenzkompartiment Y

$P_{P(X/Y)}$: Punktedichte einer Struktur X im Referenzkompartiment Y

$$P_{P(X/Gewebe)} = \sum P_{(X)} / \sum P_{(Y)}$$

$\sum P_{(X)}$: Summe der pro Fall im Kompartiment Y auf die Struktur X treffenden Punkte

$\sum P_{(Y)}$: Summe der pro Fall auf das Kompartiment Y treffenden Punkte. In der vorliegenden Arbeit stellt Y die gesamte Gewebeanschnittsfläche, beziehungsweise die Gesamtfläche des Anschnittes von Tumorgewebe oder Tumorepithel innerhalb der Gewebeanschnittsfläche dar.

Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel™) wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Flächenanteile des Tumorgewebes im Gewebeschnitt ($A_{A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})}$), der epithelialen Tumorzellen im Tumorgewebe ($A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$), der MCT1- und MCT4-positiven Zellen im epithelialen Tumoranteil ($A_{A(\text{MCT1-positive Zellen/Tumorepithel})}$) beziehungsweise ($A_{A(\text{MCT4-positive Zellen/Tumorepithel})}$), der MCT1/4-doppelt-positiven Zellen im epithelialen Tumoranteil ($V_{V(\text{MCT1\&MCT4-positive Zellen/Tumorepithel})}$) und der Gefäße im Tumor ($A_{A(\text{Gefäße/Tumor})}$) errechnet.

Die graphische Darstellung der errechneten Flächendichten erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, San Diego, USA). Die in dieser Arbeit ermittelten Daten wurden in Streudiagrammen dargestellt.

4. Verwendete Materialien

4.1. Geräte

Abzug	Maßanfertigung
Brutschrank 37°C	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Computer	K&R Computersysteme GmbH, München
Elektronischer Timer und Stoppuhr	TFA Dostmann GmbH & Co.KG, Wertheim
Kamera Olympus DP72	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Kühl-Gefrier-Kombi AEG Öko Santo Electronic	Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Mikroskoptisch und Steuerung	Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG, Wetzlar
Mikrowelle MW 800	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Objektive (1,25-, 4-, 10-, 20-fach)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Pipetten PIPETMAN®, einstellbar (200 - 1000 µl, 30 - 200 µl, 20 - 100 µl, 0,5 - 10 µl, 0,1 - 2 µl)	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, Frankreich
Software newCAST	Visiopharm®, Hoersholm, Dänemark
Statistikprogramm Graphpad Prism 6	Graphpad Software, San Diego, USA
Stereologieprogramm Visiomorph	Visiopharm®, Hoersholm, Dänemark
Systemmikroskop Olympus BX41	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel™	Microsoft, Redmond, USA
Tischzentrifuge	Abbott Laboratories GmbH, Hannover

4.2. Material

Blaubrand® Messkolben 50 ml, 100 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Deckgläschen	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Einmalhandschuhe Sterling Nitrile	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Färbeglasbox	Duran Group GmbH, Wertheim
Färbeschaukel	Duran Group GmbH, Wertheim
Glaspipette 10 ml	witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Glasreagenzgläser 10 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Glastrichter	Duran Group GmbH, Wertheim
Laborflasche 1000 ml	Duran Group GmbH, Wertheim
Messzylinder 250 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Objektträger StarFrost®	Engelbrecht, München
Pasteurpipetten aus Glas, 150 mm	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Peleusball	Assistent® Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim v. d. Röhn
Parafilm M®	Pechiney Deutschland GmbH, Düsseldorf
Pipettenspitzen Standard (50 - 1200 µl, 1 - 200 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen Standard Kristall (0,5- 10 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen Standard Mikro (0,1- 10 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Reagenzgläser Greiner Bio-One	Altmann Analytik GmbH & Co.KG, München
Reaktionsgefäß Eppi	Eppendorf AG, Hamburg
Rundfilter, 70 mm	Altmann Analytik GmbH & Co.KG, München

4.3. Reagenzien

Aqua Destillata (Aqua dest.)

Citronensäure	AppliChemi GmbH, Darmstadt
Cytokeratin, Monoclonal Mouse, Anti-Human, Clones AE1/AE3	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DAB, pH 7,0	KEM-EN-TEC Diagnostics, Taastrup, Dänemark
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChemi GmbH, Darmstadt
Eosin B	AppliChemi GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum	MP Biomedicals Germany, Heidelberg
HistoGreen	Linaris, Dossenheim
Histokitt	Assistent® Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim v. d. Röhn
ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector	Linaris, Dossenheim
Kaliumhydrogenphosphat	AppliChemi GmbH, Darmstadt
LinBlock	Linaris, Dossenheim
Mayer's Hämalun	AppliChemi GmbH, Darmstadt
MCT1, Polyclonal Rabbit, Anti-Human	EMD Millipore Corp., Temecula, USA
MCT4, Polyclonal Rabbit, Anti-Human	EMD Millipore Corp., Temecula, USA
Methanol p.A. CH ₄ O	AppliChemi GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChemi GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	AppliChemi GmbH, Darmstadt
NovaRED™ Substrate Kit, Vector	Linaris, Dossenheim
Triton X	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Von Willebrand Factor, Polyclonal	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Rabbit Anti-Human**Wasserstoffperoxid reinst, 30 %****AppliChem GmbH, Darmstadt****Xylol reinst****SAV Liquid Production GmbH,
Flintsbach am Inn**

IV. ERGEBNISSE

1. Histopathologische Befunde

Die untersuchten kaninen oralen Plattenepithelkarzinome wiesen unterschiedlich stark ausgeprägte Malignitätskriterien wie Kernpleomorphie und Mitosen, sowie teilweise Bereiche mit Nekrose und neutrophiler Infiltration auf (siehe Abbildung 3).

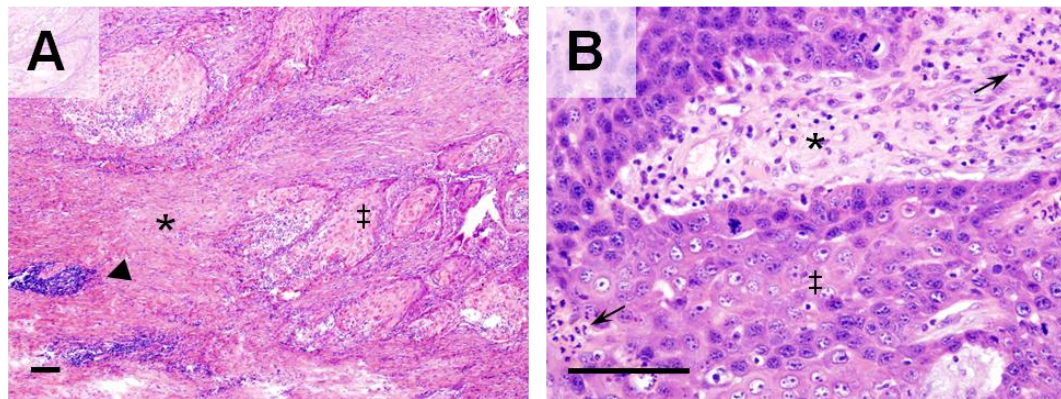


Abbildung 3: Histopathologie eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinoms. **A:** (Übersicht, 40fache Vergrößerung) und **B:** (200fache Vergrößerung): Epitheliales (†) und nicht-epitheliales (*) Tumorgewebe. Nekrose mit neutrophiler Infiltration (Pfeile in B). Periphere Lymphozyteninfiltration (Pfeilspitze). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Maßstabsleiste = 100 µm.

2. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

2.1. Flächenanteil des Tumors am Gewebeschnitt

Der Flächenanteil des Tumorgewebes im Gewebeschnitt ($A_{A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})}$) betrug in den 40 untersuchten Fällen durchschnittlich $69,2 \pm 12,7 \%$, wobei minimal 46,4 %, maximal 97,0 % als Tumorgewebe im Gesamtgewebe identifiziert wurden. Siehe Abbildung 4: .

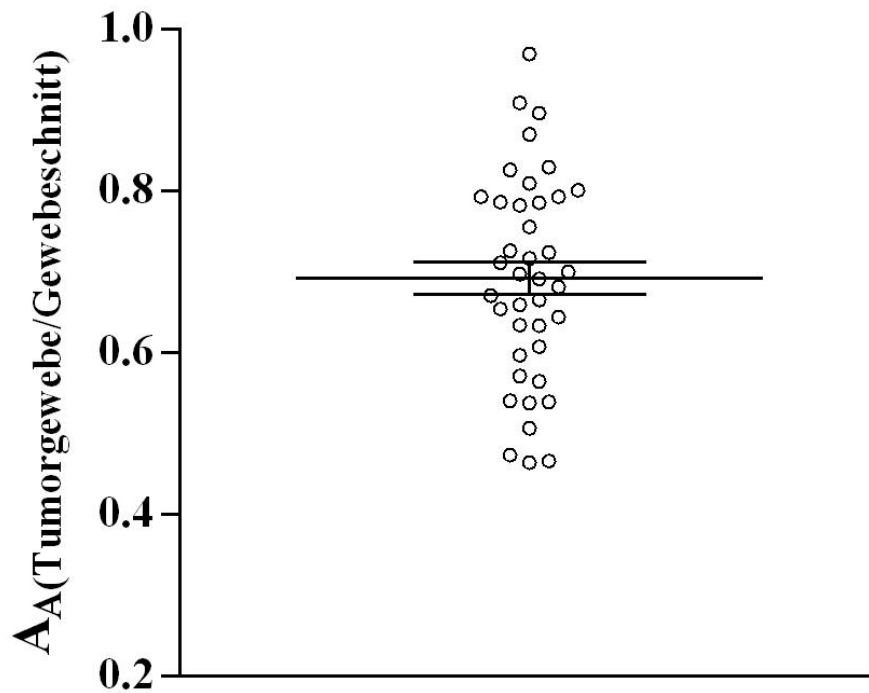


Abbildung 4: Verteilung der Flächenanteile des Tumorgewebes in den Gewebeschnitten $A_A(\text{Tumorgewebe/Gewebeschnitt})$ sämtlicher untersuchter Fälle. Streudiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung.

2.2. Zytokeratin-Immunoreaktivität

In der vorliegenden Studie wurde die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin zur Ermittlung des epithelialen Anteils des beprobten Gewebes verwendet. Die nach einem etablierten Routineprotokoll durchgeführte immunhistologische Darstellung von Zytokeratin erlaubte eine zuverlässige Detektion epithelialer Zellen mit nur sehr geringer unspezifischer Hintergrundfärbung.

2.2.1. Qualitative Auswertung

In allen 40 untersuchten Proben sowie in den Positivkontrollen kaniner Maulschleimhaut zeigte sich ein deutliches zytoplasmatisches Signal in epithelialen Zellen (siehe Abbildung 5). In den Negativkontrollen wurde keine Immunoreaktivität detektiert.

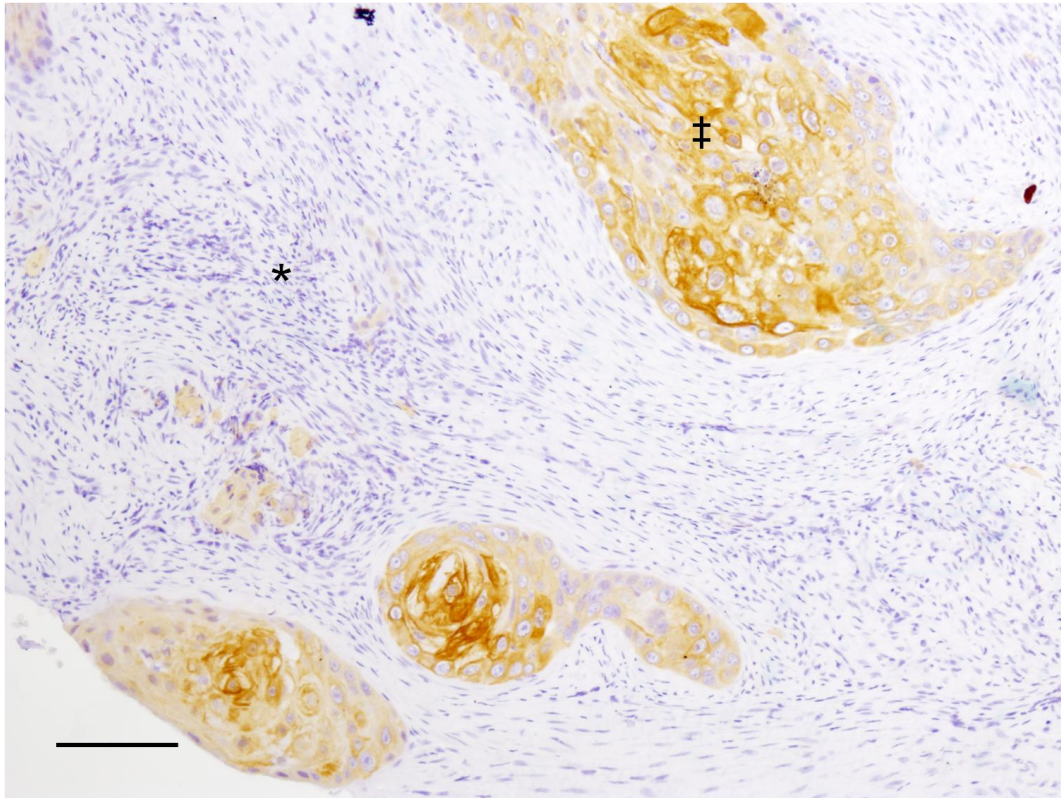


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin in den epithelialen Anteilen eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinomes. Zytokeratin-positive Zellen stellen sich braun dar. Epitheliales (†) und nicht-epitheliales (*) Tumorgewebe. 100fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 µm.

2.2.2. Quantitativ-morphologische Auswertung

In den untersuchten Proben wurden die Anschnittsprofile derjenigen Zellen ausgewertet, die eine positive Zytokeratin-Immunoreaktivität zeigten. Der Flächenanteil epithelialer Tumorzellen am Tumorgewebe $A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$ als Parameter zur Vergleichbarkeit der untersuchten Proben betrug durchschnittlich $47,2 \pm 17,5$. Siehe Abbildung 6.

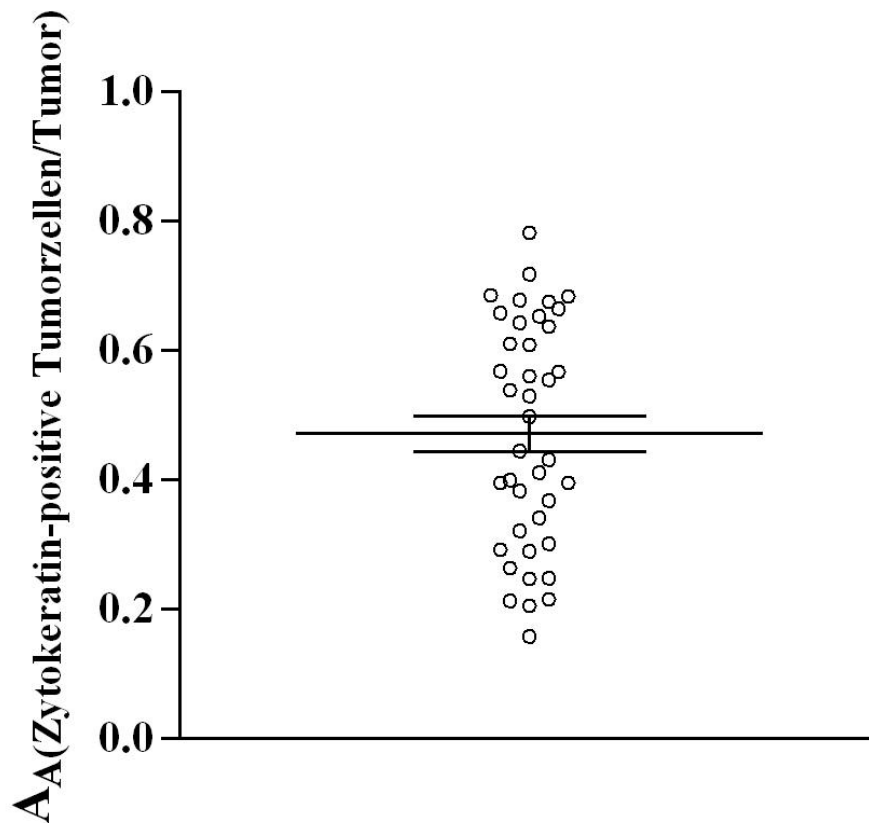


Abbildung 6: Verteilung der Flächenanteile des Zytokeratin-positiven Tumorepithels in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen $A_{A(\text{Zytokeratin-positive Tumorzellen/Tumor})}$ in sämtlichen untersuchten Schnitten. Streudiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung.

2.3. MCT1 und MCT4-Immunoreaktivität

Der immunhistochemische Nachweis der beiden Proteine MCT1 und MCT4 gelang in allen untersuchten Proben. Mithilfe der simultanen immunhistologischen Darstellung von MCT1 und MCT4 (Doppel-IHC) konnte die gleichzeitige Expression beider Monocarboxylattransporter in einzelnen Tumorepithelzellen kaniner oraler Plattenepithelkarzinome demonstriert werden.

2.3.1. Qualitative Auswertung

MCT1-Immunoreaktivität stellte sich hauptsächlich in den epithelialen Tumorzellen dar. Bei geringer unspezifischer Hintergrundfärbung zeigten diese ein überwiegend membranäres Signal (siehe Abbildung 7). Dies war auch bei der mitgeführten Positivkontrolle (kanine Skelettmuskulatur) erkennbar (siehe Abbildung 10 (A)).

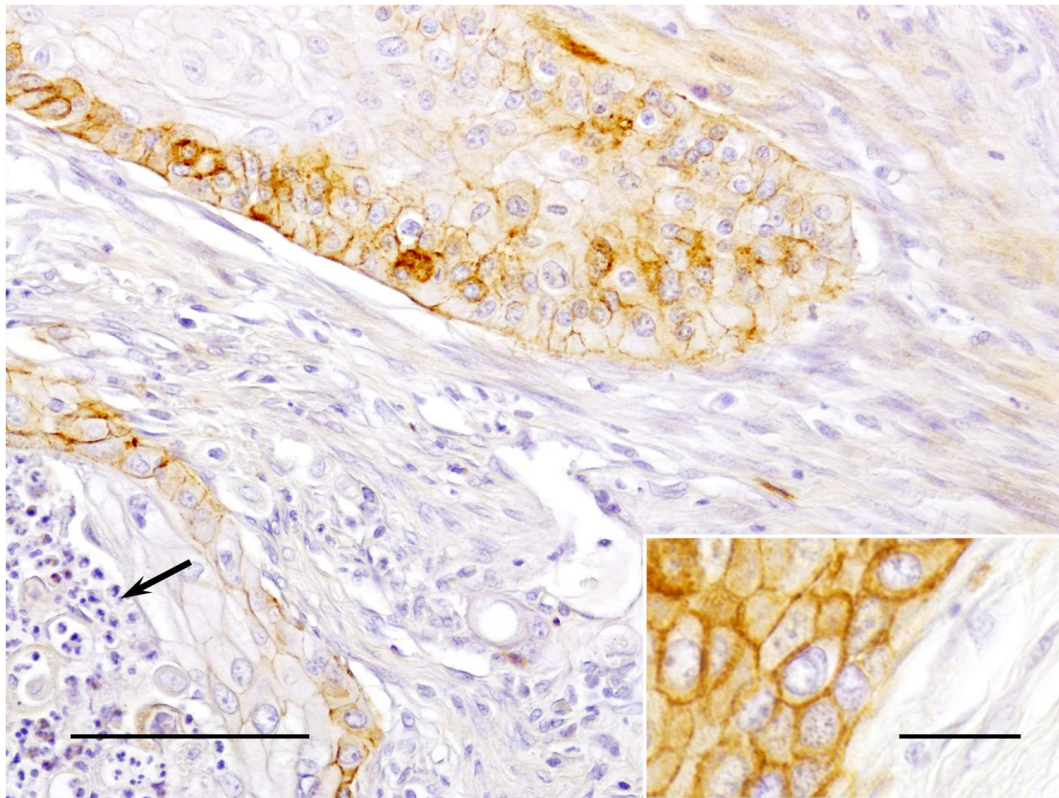


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von MCT1 in epitheliale Tumorgewebe eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinomes. Die MCT1-positiven Zellen stellen sich braun dar und zeigen ein überwiegend membranäres Signal. Epitheliales (‡) Tumorgewebe und Nekrose mit neutrophiler Infiltration (Pfeil). 200fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 µm. Einfügung: 400fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 25 µm.

Ein positives MCT4-Signal wurde bei epithelialen Tumorzellen und mesenchymalen Zellen detektiert, wobei die Tumorepithelzellen eine deutlich stärkere Signalintensität aufwiesen. Bei kaum vorhandener unspezifischer Hintergrundfärbung zeigten epitheliale Tumorzellen ein weitgehend zytoplasmatisches Signal (siehe Abbildung 8). Diese Ergebnisse stimmten mit der mitgeführten Positivkontrolle (kanines Lebergewebe) überein (siehe Abbildung 10 (B)).

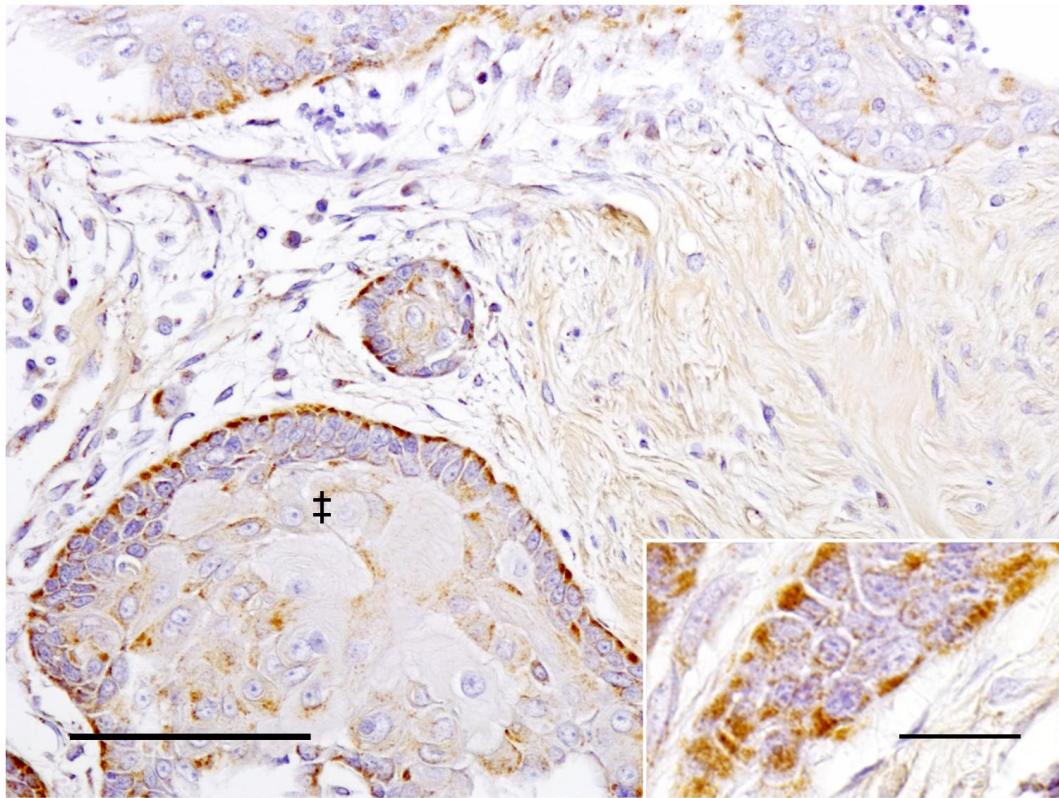


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von MCT4 in epithelialem Tumorgewebe eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinomes. Die MCT4-positiven Zellen stellen sich braun dar und zeigen ein überwiegend zytoplasmatisches Signal. Epitheliales (†) Tumorgewebe zeigt eine deutlichere Immunoreaktivität als das umgebende Stroma. 200fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 µm. Einfügung: 400fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 25 µm.

Durch die simultane immunhistochemische Detektion von MCT1 und MCT4 konnte deren Koexpression in epithelialen Tumorzellen gezeigt werden. Alle 40 Proben verfügten über Bereiche, in denen sowohl membranäres Signal für MCT1, als auch zytoplasmatisches Signal für MCT4 erkennbar war (siehe Abbildung 9). Dabei fiel auf, dass annähernd alle MCT1-positiven Zellen auch ein positives MCT4-Signal zeigten.

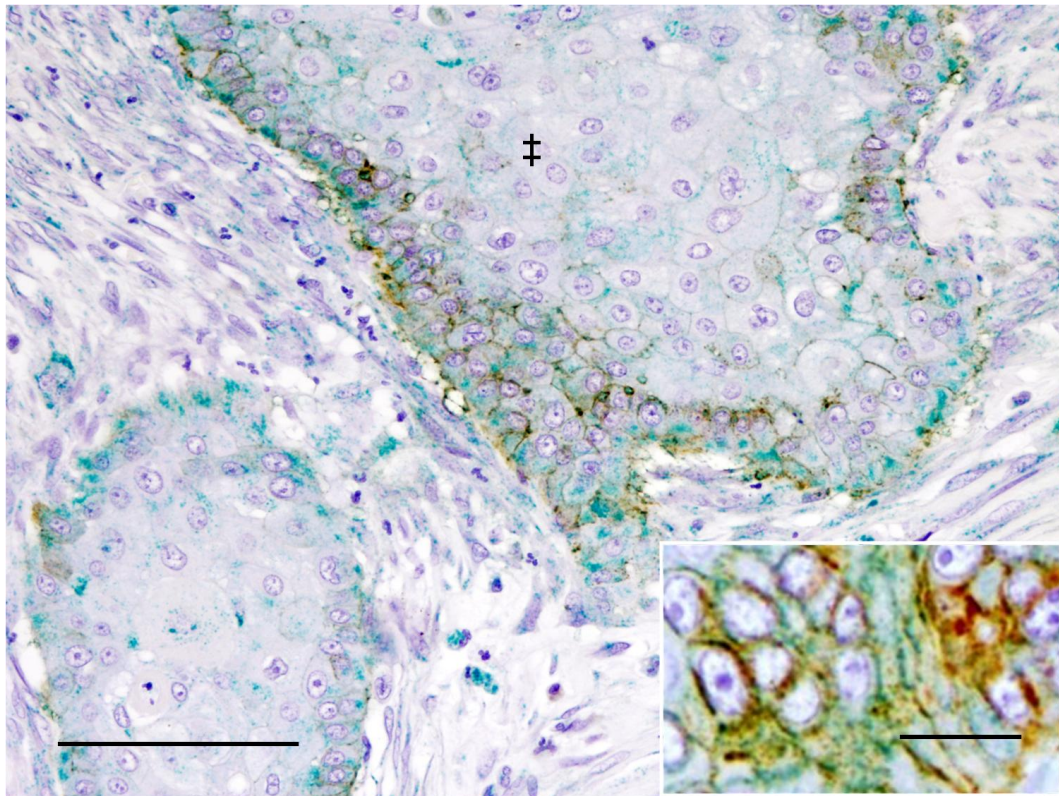


Abbildung 9: Simultaner immunhistochemischer Nachweis von MCT1 und MCT4 (Doppel-IHC) in epithelialen Tumorzellen eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinomes. Die MCT1-positiven Zellen stellen sich braun dar und zeigen ein überwiegend membranäres Signal. Die MCT4-positiven Zellen sind grün markiert und zeigen ein überwiegend zytoplasmatisches Signal. Epitheliales (⊕) Tumorgewebe zeigt eine deutlichere Immunoreaktivität als das umgebende Stroma. 200fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 µm. Einfügung: 400fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 25 µm.

Alle mitgeführten Negativkontrollen wiesen keine Immunoreaktivität auf (Abbildung 10 (C)).

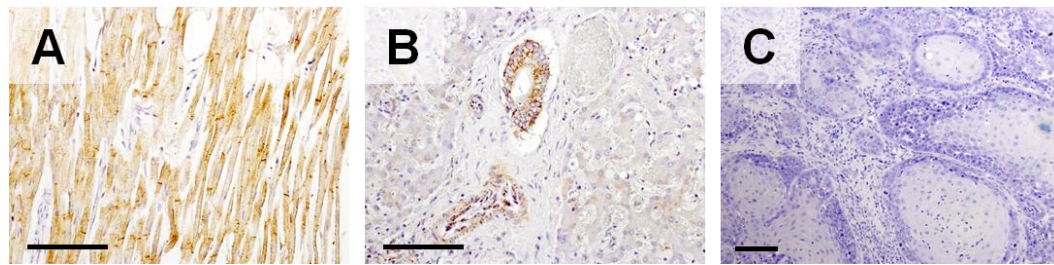


Abbildung 10: Immunhistochemischer (IHC) Nachweis von MCT1 in kaninem Skelettmuskel (A) und MCT4 in kaninem Lebergewebe (B). **A:** Positivkontrolle MCT1-IHC. Deutliche MCT1-Immunoreaktivität (braunes Signal) in den quergestreiften Muskelzellen. 250fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 μ m. **B:** Positivkontrolle MCT4-IHC. Deutliche MCT4-Immunoreaktivität (braunes Signal) in Gallengangsepithelien und Gefäßendothelien. **C:** Negativkontrolle zu B. Kanines orales Plattenepithelkarzinom. Keine Immunoreaktivität nachweisbar. 100fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 μ m.

2.3.2. Quantitativ-morphologische Auswertung

Der Flächenanteil der MCT1-positiven Zellenanschnitte im epithelialen Anteil des Tumors $A_{A(MCT1\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$ betrug durchschnittlich $20,3 \pm 15,1$ % wohingegen der durchschnittliche Anteil von MCT4-positiven Zellen ($A_{A(MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) mit $51,6 \pm 16,1$ % mehr als doppelt so hoch war.

Der Flächenanteil der Zellanschnitte, in denen gleichzeitig sowohl MCT1, als auch MCT4 nachgewiesen wurde ($A_{A(MCT1\&MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$), betrug $19,3 \pm 14,1$ %. Der Großteil der Zellprofile, in denen ein MCT1-positives Signal nachgewiesen wurde, zeigte auch MCT4-Immunoreaktivität (Abbildung 11).

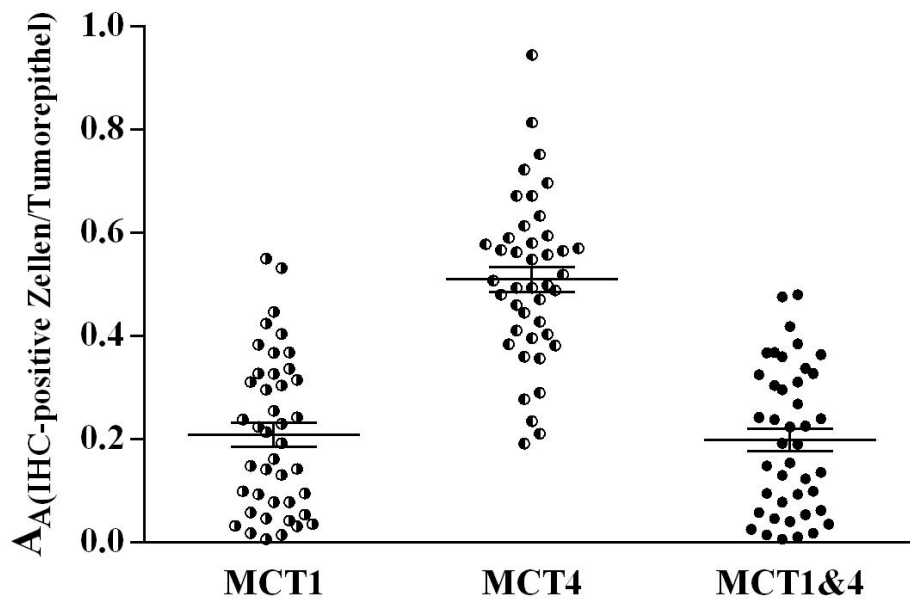


Abbildung 11: Verteilung der Flächenanteile MCT1-positiver Tumorzellen/Tumorepithel ($A_A(\text{MCT1-positive Tumorzellen/Tumorepithel})$), MCT4-positiver Tumorzellen/Tumorepithel ($A_A(\text{MCT4-positive Tumorzellen/Tumorepithel})$) und MCT1- und MCT4-positiver Tumorzellen/Tumorepithel ($A_A(\text{MCT1\&MCT4-positive Tumorzellen/Tumorepithel})$) in sämtlichen untersuchten Schnitten kaniner oraler Plattenepithelkarzinome. Streudiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung.

2.4. Von Willebrand Faktor-Immunoreaktivität

Die nach einem etablierten Standardprotokoll durchgeführte immunhistochemische Darstellung des vWF diente in der vorliegenden Studie zur immunhistochemischen Markierung von Endothelzellen zur Darstellung der Vaskularisierung des Tumorgewebes.

2.4.1. Qualitative Auswertung

Alle 40 untersuchten Gewebeschnitte und die mitgeführten Positivkontrollen (kanine Maulschleimhaut) zeigten bei gering bis mittelgradig ausgeprägter unspezifischer Hintergrundfärbung eine deutliche vWF-Expression in den Anschnitten der Endothelzellen. Diese wiesen ein überwiegend zytoplasmatisches Signal auf (Abbildung 12). In den mitgeführten Negativkontrollen wurde keine Immunoreaktivität detektiert.

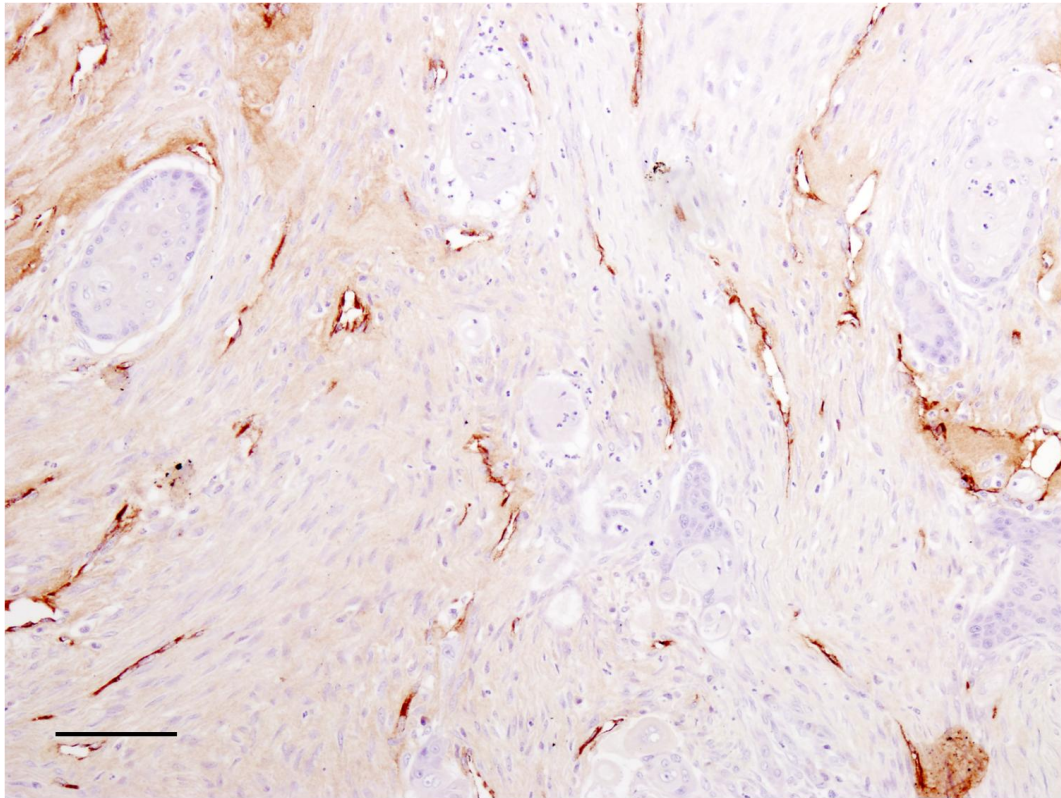


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis des von Willebrand Faktors (vWF) in epithelialem Tumorgewebe eines kaninen oralen Plattenepithelkarzinomes. VWF-positive Zellen stellen sich rotbraun dar. 100fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100 μm .

2.4.2. Quantitativ-morphologische Auswertung

Der Flächenanteil der Gefäße und Kapillaren im Tumorgewebe ($A_{A(\text{Gefäße/Tumor})}$) betrug durchschnittlich $6,4 \pm 2,2 \%$. Siehe Abbildung 13.

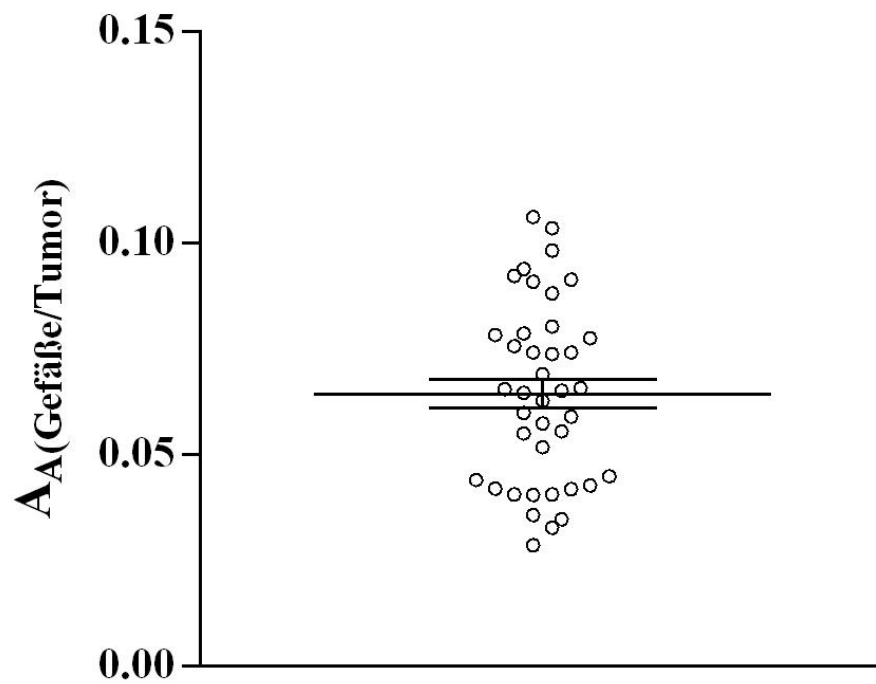


Abbildung 13: Verteilung der Flächenanteile von Blutgefäßanschnitten in sämtlichen untersuchten Schnitten kaniner oraler Plattenepithelkarzinome ($A_A(\text{Gefäße/Tumor})$). Streudiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung.

V. DISKUSSION

Die Monocarboxylattransporter 1 und 4 nehmen als essentielle Laktat-Transporter eine Schlüsselfunktion im Tumorstoffwechsel ein. Da solide Tumoren unter hypoxischen Bedingungen ihre Energie über Glykolyse beziehen, werden große Mengen an Glukose verstoffwechselt und es entsteht Laktat (WU & RACKER, 1959). Dieses wird über MCT4 aus den Zellen ausgeschleust und kann von normoxischen Zellen über MCT1 wieder aufgenommen und der Atmungskette zugeführt werden (SONVEAUX et al., 2008). Die Korrelation zwischen der Expression von MCT1 und MCT4 in Tumoren und einer ungünstigen Prognose wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (NAKAYAMA et al., 2012) (BAEK et al., 2014). Dies macht MCT1 und MCT4 zu einem wichtigen Forschungsgebiet mit der Intention einer spezifischen chemotherapeutischen Hemmung (MATHUPALA et al., 2004; FANG et al., 2006; SONVEAUX et al., 2012; AMORIM et al., 2015; GURRAPU et al., 2015; HANSON et al., 2015). Da bei allen kaninen Plattenepithelkarzinomen eine Expression von MCT1 und MCT4 gezeigt werden konnte, kann dies eine hervorragende Tumorentität für den Einsatz von spezifischen Inhibitoren von MCT1 und MCT4 für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen darstellen. Ein solcher therapeutischer Ansatz kann auch einen Einfluss auf die Therapie von humanen Kopf-Halstumoren haben.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Expressionsmuster von MCT1 und MCT4 in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen zu charakterisieren. Es sollte geklärt werden, ob mithilfe der simultanen Darstellung beider Marker deren Koexpression nachweisbar ist, welche als Methode zur Darstellung zyklischer Hypoxie erforscht wird (WERGIN et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die beiden Monocarboxylattransporter 1 und 4 in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen exprimiert werden. Der Nachweis erfolgte über die immunhistochemische Detektion beider Proteine in Paraffinschnitten von 40 kaninen oralen nicht-tonsillären Plattenepithelkarzinom-Bioptaten. Durch die simultane Darstellung von MCT1 und MCT4 (Doppel-IHC) konnte erstmalig auch die Koexpression beider Proteine in epithelialen Tumorzellen auf zellulärer Ebene gezeigt werden. Es wird angenommen, dass die Koexpression von MCT1 und MCT4 im

Tumorgewebe ein Marker für zyklische Hypoxie ist. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass beide Transporter grundlegend unterschiedliche Funktionen (In- oder Export von Laktat) erfüllen (DIMMER et al., 2000; HALESTRAP & MEREDITH, 2004), welche für den Zellstoffwechsel essentiell sind. Um die Redox-Homöostase aufrechtzuerhalten findet unter hypoxischen Bedingungen ein Wechsel von der oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Energiegewinnung statt (WARBURG et al., 1927; KIM et al., 2006; ZHANG et al., 2008). Für den Erhalt einer ausgewogenen Energiebilanz benötigen Zellen große Mengen an Glukose (SEAGROVES et al., 2001; SEMENZA, 2008). Die notwendige Energie wird nun über die anaerobe Glykolyse bereitgestellt, wodurch Laktat entsteht. Dieses diffundiert aus benachbarten hypoxischen Tumorregionen in gut oxygenierte Bereiche und wird dort verstoffwechselt. Im Gegensatz dazu kann die zur Verfügung stehende Glukose den hypoxischen Tumorzellen zur Energiegewinnung bereitgestellt werden (SONVEAUX et al., 2008). MCT1 und MCT4 spielen eine entscheidende Rolle bei diesem Laktattransport. Bei chronisch hypoxischen Tumoren konnte ihre Expression bereits nachgewiesen werden (ULLAH et al., 2006; RADEMAKERS et al., 2011).

In einer bisher unveröffentlichten Studie von Wergin et al. (WERGIN et al., 2015) wurde in Zellkultur-Versuchen mit humanen Kopf-Halstumor-Zelllinien, sowie einer kaninen oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, die Korrelation zwischen einer Koexpression von MCT1 und MCT4 und dem Auftreten zyklischer Hypoxie dargestellt. Hierfür wurden humane und kanine Tumorzellen in einer Hypoxiekammer unterschiedlichen Hypoxiezyklen unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Sauerstoffmangel MCT4 innerhalb von zwei Stunden hochreguliert wurde, während die Expression von MCT1 über einen Zeitraum von 18 Stunden abnahm. Durch diese Überschneidung kann es zu einer Koexpression beider Transporter kommen. In normoxischen Zellen wurde MCT1 in einem Medium, das wenig Glukose und viel Laktat enthielt, innerhalb von zwölf Stunden hochreguliert. Auch De Saedeleer et al. (DE SAEDELEER et al., 2014) konnten in Versuchen die vermehrte Expression von MCT1 in humanen Tumorzelllinien unter Glukosemangel darstellen.

Im Rahmen der Versuche von Wergin et al. (WERGIN et al., 2015) wurde zur Validierung der in-vitro-Ergebnisse eine prospektive Studie bei humanen Kopf- und Halstumoren durchgeführt. Dabei wurde Patienten vor der chirurgischen

Tumorentfernung der exogene Hypoxiemarker Pimonidazol (EF5) (RALEIGH et al., 1999) intravenös appliziert. Nach der Tumorresektion wurde das Gewebe immunhistochemisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in normoxischen Tumorearealen vermehrt MCT1, in hypoxischen – also EF5-positiven – Gebieten hingegen vermehrt MCT4 exprimiert wird. In einigen Bereichen der Tumoren kam es auch zu einer Überlappung der Expression von MCT1, MCT4 und EF5. Es wurde angenommen dass es sich hierbei um Bereiche mit zyklischer Hypoxie handelt.

Wird diese Hypothese, dass bei einer Koexpression der beiden Transporter MCT1 und MCT4 in der jeweiligen Tumorregion eine zyklische Hypoxie vorgelegen hat, für die vorliegende Studie übernommen, liegt der Flächenanteil von zyklisch hypoxischen Zellen der untersuchten Proben kaniner oraler Plattenepithelkarzinome bei $19,3 \pm 14,1$ %. Dies stellt den Großteil der Zellen dar, die ein MCT1-positives Signal zeigten ($20,3 \pm 15,1$ %). Eine ausschließliche MCT4-Expression zeigten 32,3 % der Anschnitte epithelialer Tumorzellen. Es wird angenommen, dass diese Zellen somit überwiegend diffusionsbedingten, chronisch hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren (RADEMAKERS et al., 2011; CURRY et al., 2013). MCT1 wurde in den vorliegenden Fällen hauptsächlich in epithelialen Zellen exprimiert. Daher erfolgte die Bestimmung des Flächenanteils des Tumorepithels am Gewebeschnitt $A_{A(\text{Tumorepithel}/\text{Gewebeprobe})}$ und des Flächenanteils der MCT1-positiven Zellenanschnitte im epithelialen Anteil $A_{A(\text{MCT1}/\text{Tumorepithel})}$. Der Flächenanteil der MCT1-positiven Zellen am gesamten Tumorgewebe wurde nicht bestimmt, da in der vorliegenden Studie über kanine orale Plattenepithelkarzinome vorrangig die Karzinomzellen von Interesse waren.

Um das Ausmaß der Expression der immunhistochemischen Marker zu ermitteln, erfolgte die Bestimmung der Flächenanteile durch quantitative morphologische Analyseverfahren (HOWARD & REED, 2005). Da aufgrund des retrospektiven Ansatzes der Studie nur insgesamt 10 konsekutive Schnitte aus der Mitte der Gewebeproben – entsprechend in etwa der „Mitte“ des palpierbaren Tumors – zur Verfügung standen, war eine Abschätzung der Volumenanteile beziehungsweise der absoluten Volumina von MCT1- und MCT4-positiven epithelialen Tumorzellen im gesamten Tumor, oder gar die Ermittlung der numerischen Volumendichten MCT1- und MCT4-positiver Zellen im Tumorepithel nicht

möglich. Zur Analyse dieser Parameter sollten in nachfolgenden Studien geeignete Proben für quantitativ stereologische Analysen gewonnen werden.

In der vorliegenden Studie diente der immunhistochemische Nachweis von Zytokeratin der Identifizierung epithelialer Tumorzellen in den Tumorschnittflächen der Gewebeschnitte. Zytokeratine sind Heterodimere, die über intrazelluläre Filamentbildung an der mechanischen Stabilisierung und anderen Aufgaben in Epithelzellen beteiligt sind. Der immunhistochemische Marker dient der zuverlässigen Identifizierung von Geweben epithelialen Ursprungs. Die Bestimmung des Flächenanteils epithelialer Tumorzellen in den Tumorschnittflächen der Gewebeschnitte sollte eine Vergleichbarkeit der Schnitte verschiedener Fälle untereinander gewährleisten. In den untersuchten Proben lag der epitheliale Flächenanteil am Tumorgewebe bei $47,2 \pm 17,5 \%$, dies bedeutet, dass in etwa die Hälfte des Tumorgewebes aus Stroma und Nekrose bestand.

Mithilfe der immunhistochemischen Darstellung des von Willebrand Faktors (vWF) wurde der Flächenanteil der Blutgefäße in den Tumorschnitten ermittelt. Dieser betrug durchschnittlich etwa 6 %. Daraus lässt sich allerdings nicht auf den Grad der Oxygenierung eines Tumoreals schließen, da es gerade unter akut hypoxischen Bedingungen aufgrund von vaskulärer Stase und Schwankungen im Erythrozytenfluss trotz vorhandener Gefäßstruktur zu einer Sauerstoffunterversorgung im Gewebe kommen kann (KIMURA et al., 1996; JORDAN & SONVEAUX, 2012).

Der Flächenanteil der ausschließlich MCT4-positiven (chronisch hypoxischen) Epithelzellen ($A_{A(MCT4\text{-positive Zellen/Tumorepithel})}$) lag bei 32,3 %, der Anteil der MCT1- und MCT4-positiven (zyklisch hypoxischen) Epithelzellen bei 19,3 %. Daraus ließe sich schließen, dass im Durchschnitt die Hälfte des hier untersuchten Tumorepithels kaniner oraler Plattenepithelkarzinome normoxisch ist. Da chronische Hypoxie aufgrund von limitierter Diffusion durch eine ungenügende Vaskularisierung entsteht (THOMLINSON & GRAY, 1955; VAUPEL et al., 1989), könnte mit dem vorliegenden Ergebnis rückgeschlossen werden, dass circa die Hälfte des Tumorgewebes der untersuchten Proben über eine ausreichende Gefäßdichte (MVD) verfügen. Diese Hypothese stimmt mit den Resultaten einer Studie von Rohrer Bley et al. (ROHRER BLEY et al., 2009) überein, bei der die Vaskularisierung, der Sauerstoffpartialdruck und das Blutvolumen von kaninen

oralen Fibrosarkomen, Plattenepithelkarzinomen und Melanomen verglichen wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass orale Plattenepithelkarzinome stark vaskularisierte Tumoren sind und den höchsten Sauerstoffpartialdruck unter den drei gemessenen Tumorarten aufweisen. Dies könnte auch das Therapieansprechen von kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen auf Strahlentherapie erklären. LaDue-Miller et al. (LADUE-MILLER et al., 1996) zeigten, dass Strahlentherapie eine effektive Behandlungsmethode bei nicht-tonsillären Plattenepithelkarzinomen beim Hund darstellt. In einer Studie von Ito et al. (ITO et al., 2001) konnten nachgewiesen werden, dass die Radiosensitivität von Rezidiven von humanen Plattenepithelkarzinomen mit der Gefäßdichte (MVD) positiv korreliert. In Versuchen mit humanen oropharyngealen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass parakrine Faktoren aus Endothelzellen die Radiosensitivität der Tumorzellen erhöhten (ROSSI et al., 2004). Veterinärmedizinisch stehen derartige Studienergebnisse im Moment noch nicht zur Verfügung.

Der Nachweis von MCT1 und MCT4 spielt auch aus therapeutischer Sicht eine entscheidende Rolle. Derzeit gibt es verschiedene therapeutische Interventionen, die speziell auf hypoxische Tumoren ausgerichtet sind (WALSH et al., 2014). Über die Verabreichung von Erythropoietin (DOLESCHER et al., 2015) oder durch Akzelerierte Radiotherapie mit Carbogen und Nikotinamid (accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide, ARCON) (DENEKAMP & FOWLER, 1997; KAANDERS et al., 2002) soll beispielsweise die Oxygenierung des Tumorgewebes verbessert werden. Radiosensitizer (Strahlungssensibilisatoren) imitieren den Effekt von Sauerstoff und veranlassen somit die Bildung und Stabilisierung von toxischen DNS-Radikalen (OVERGAARD, 1994; ROWINSKY, 1999; METWALLY et al., 2014). Andere Medikamente entfalten ihre Wirkung gezielt unter hypoxischen Bedingungen und verstärken den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika, wie beispielsweise Tirapazamin (BROWN, 1999). Da die genannten therapeutischen Interventionen mit einer erhöhten Toxizität einhergehen, ist eine Selektion von Patienten mit hypoxischen Tumoren vor der Wahl der Therapie sinnvoll. Dies könnte beispielsweise mithilfe endogener Hypoxiemarker geschehen. Zu diesem Zweck ist die Etablierung eines zuverlässigen endogenen Hypoxiemarkers unerlässlich. Aktuell sind noch keine etablierten endogenen Marker verfügbar, die ausschließlich hypoxiespezifisch

sind (VORDERMARK & BROWN, 2003). Ob die Monocarboxylattransporter 1 und 4 sich dafür eignen, muss im Rahmen weiterer Studien überprüft werden.

Durch den Einsatz des etablierten exogenen Hypoxiemarkers Pimonidazol im Rahmen einer prospektiven Studie könnte die Spezifität von MCT1 und MCT4 als endogene Hypoxiemarker weiter untersucht werden. Rademakers et al. (RADEMAKERS et al., 2011) erforschten an frischgefrorenen Resektaten von humanen Kopf- und Halstumoren die Expression und Gewebeverteilung von HIF-1a, CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 und MCT4 im Vergleich zu Pimonidazol. Sie konnten darstellen, dass MCT1 sowohl in normoxischen, als auch hypoxischen Geweben in Korrelation mit CAIX exprimiert wurde. Die Expression von MCT4 wies eine starke Korrelation mit GLUT-1 auf und zeigte ein typisches Verteilungsmuster für diffusionsbedingt hypoxische Zellen. Da jedoch auch MCT1 in größerer Entfernung von Gefäßen dargestellt werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Transporter entweder für den Laktatimport, oder zur Unterstützung des Laktatexports durch MCT4 zuständig ist. In Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Untersuchungen von Wergin et al. (WERGIN et al., 2015) könnte es sich bei einer Koexpression beider Transporter auch um Bereiche mit zyklischer Hypoxie handeln.

Durch den immunhistochemische Nachweis der Monocarboxylattransporter 1 und 4 sowie deren Koexpression in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen stellt die hier durchgeführte Studie die Grundlage für weitere Forschungen zur sogenannten Tumor-Hypoxie-Kartographie zur Unterscheidung von chronisch und zyklisch hypoxischen Tumorearealen dar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Hypoxie kommt in vielen soliden Tumoren vor und ist maßgeblich an einer ungünstigen Prognose beteiligt. Während der chronischen Hypoxie eine mangelhafte Diffusion aufgrund von unzureichenden oder unorganisiert gebildeten Blutgefäßen zugrunde liegt, entsteht akute Hypoxie durch eine Störung der Perfusion.

Bedingt durch die Hypoxie wird die von den Zellen benötigte Energie vornehmlich über anaerobe Glykolyse bezogen. Dabei entsteht viel Laktat, welches aus den Zellen exportiert werden muss. Unter normoxischen Bedingungen kann es wieder in die Zellen aufgenommen und nach Umwandlung in Pyruvat dem Zitratzyklus zugeführt werden. Die Funktion des Laktattransportes übernehmen die sogenannten Monocarboxylattransporter (MCTs).

Im Tumorstoffwechsel nehmen besonders MCT1 und MCT4 eine wichtige Rolle ein. MCT4 schleust über einen protonengebundenen Symport Laktat aus der Zelle aus, wohingegen MCT1 dieses in normoxischen Tumorregionen wieder in die Zellen importieren kann. Aufgrund dieser Schlüsselfunktion gelten MCT1 und MCT4 als potentielle Marker zur Identifizierung hypoxischer Bereiche im Tumor. Bisher gibt es noch keine etablierten endogenen Marker, die ausschließlich hypoxiespezifisch sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen MCT1 und MCT4 immunhistochemisch detektiert werden können. Mithilfe der simultanen Darstellung beider Marker sollte eine mögliche Koexpression untersucht werden, welche als Methode zur Darstellung zyklischer Hypoxie erforscht wird.

Dazu wurden Paraffinschnitte von Tumorsektaten von 40 Hunden, bei denen ein orales, nicht-tonsilläres Plattenepithelkarzinom diagnostiziert wurde, immunhistochemisch untersucht. Die anschließende Auswertung erfolgte über quantitativ-morphologische Analysen.

MCT1 wurde hauptsächlich in Tumorepithelzellen und dort überwiegend membranär exprimiert, es wurde ein Flächenanteil von MCT1-positiven Zellen im Tumorepithel von $20,3 \pm 15,1$ % ermittelt. MCT4 wurde in Epithel- und

Mesenchymzellen weitgehend zytoplasmatisch exprimiert, wobei die Epithelzellen eine wesentlich stärkere Immunoreaktivität aufwiesen. Der Flächenanteil der MCT4-positiven Zellen im Tumorepithel betrug $51,6 \pm 16,1$ %. Die Flächendichte der immunhistochemisch MCT1- und MCT4-doppelt-positiven Tumorepithelzellanschnitte lag bei durchschnittlich $19,3 \pm 14,1$ %. Das bedeutet, dass der überwiegende Anteil der MCT1-positiven Tumorepithelzellen gleichzeitig eine MCT4-Koexpression zeigte. Dies kann als Hinweis auf das Vorliegen einer zyklischen Hypoxie gewertet werden. Der Anteil der Gefäße im Tumorgewebe lag bei durchschnittlich $6,4 \pm 2,2$ %.

Mit der durchgeführten Studie wurde nicht nur erstmalig die Expression von MCT1 und MCT4 in Paraffinschnitten von kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen, sondern es konnte auch zum ersten Mal die Koexpression beider Transporter durch eine Doppel-Immunhistochemie gezeigt werden. Es wird angenommen, dass die Koexpression von MCT1 und MCT4 im Tumorgewebe einen Marker für zyklische Hypoxie darstellen könnte.

Die hier durchgeführte Studie stellt somit eine Grundlage für weitere Forschungen zur sogenannten Tumor-Hypoxie-Kartographie dar.

VII. SUMMARY

Hypoxia occurs in various solid tumours and significantly contributes to a poor prognosis. Two different types of hypoxia exist: chronic and cycling. Chronic hypoxia is caused by diffusion limitations due to inadequately or disorganised blood vessels, while acute hypoxia arises from perfusion limitations.

As a consequence of the hypoxic conditions, cells generate their energy via anaerobic glycolysis instead of oxidative phosphorylation.

The export of lactate out of the cell is essential. Under normoxic conditions, lactate can be used by cells and entered into the citric acid cycle after transformation into pyruvate. So-called monocarboxylate transporters (MCTs) serve as lactate transporters.

MCT1 and MCT4 particularly play an important role in the tumour metabolism. Using a proton-symport, MCT1 shuttles lactate out of the cell, whereas MCT4 is able to transport lactate into the cell in normoxic regions of the tumour.

MCT1 and MCT4 can serve as endogenous markers to identify normoxic, cycling hypoxic and chronic hypoxic areas due to their key function in the tumour metabolism. To date, there are no established markers that are specific for hypoxia.

The present study investigated whether MCT1 and MCT4 can be detected immunohistochemically in canine oral squamous cell carcinomas. With the ability to stain for MCT1 and MCT4 on one slide, a co-expression of the marker could be evaluated. The expression of MCT1 was considered to show normoxic regions, whereas co-expression of MCT1 and MCT4 within one cell/area was considered to be an area of cycling hypoxia. Regions expressing only MCT4 were considered to be chronic hypoxic.

For this purpose, the present study used formalin fixed tumour tissue from 40 dogs. All dogs had been diagnosed with an oral, non-tonsillar squamous cell carcinoma. All specimens were stained immunohistochemically for MCT1, MCT4, cytokeratin and von Willebrand Factor.

After staining the subsequent evaluation was performed with quantitative-morphologic techniques of surface percentages of tumour epithelia within the

slide and MCT1-and MCT4-positive cells in the tumour epithelia. In addition, the amount of tumour vessels was looked at. MCT1 was expressed mainly in tumour epithelial cells and the expression was predominantly membranous. Positive MCT1 staining was found in 20.3 ± 15.1 % within the epithelium of the tumour. MCT4 was expressed in epithelial and mesenchymal cells, however the epithelial cells showed substantially stronger immunoreactivity. MCT4 was expressed in 51.6 ± 16.1 % within the epithelium of the tumour section. Double-IHC-positive cells were identified in 19.3 ± 1.1 % of the area of tumour. This means that almost all MCT1-positive cells showed MCT4 co-expression and thus indicated the presence of cyclic hypoxia. The proportion of the blood vessels in the tumour tissue was estimated to be 6.4 ± 2.2 %.

This study not only showed for the first time the expression of MCT1 and MCT4 in canine squamous cell carcinoma but it also showed co-expression of both transporters through the double immunolabeling for MCT1 and MCT4. It was concluded that the co-expression of MCT1 and MCT4 would be a marker for a cyclic hypoxia in a tumour tissue. About half of the tumour cells were showed signs of chronic hypoxia.

This study provides the basis for a further research regarding so-called tumour-hypoxia-cartography.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Alves VA, Pinheiro C, Morais-Santos F, Felipe-Silva A, Longatto-Filho A, Baltazar F. Characterization of monocarboxylate transporter activity in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 11780-7.

Amorim R, Pinheiro C, Miranda-Goncalves V, Pereira H, Moyer MP, Preto A, Baltazar F. Monocarboxylate transport inhibition potentiates the cytotoxic effect of 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 2015; 365: 68-78.

Andersen S, Solstad O, Moi L, Donnem T, Eilertsen M, Nordby Y, Ness N, Richardsen E, Busund LT, Bremnes RM. Organized metabolic crime in prostate cancer: The coexpression of MCT1 in tumor and MCT4 in stroma is an independent prognosticator for biochemical failure. *Urol Oncol* 2015; 33: 338 e9-e17.

Asada K, Miyamoto K, Fukutomi T, Tsuda H, Yagi Y, Wakazono K, Oishi S, Fukui H, Sugimura T, Ushijima T. Reduced expression of GNA11 and silencing of MCT1 in human breast cancers. *Oncology (Williston Park)* 2003; 64: 380-8.

Baba M, Inoue M, Itoh K, Nishizawa Y. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 111-6.

Baek G, Tse YF, Hu Z, Cox D, Buboltz N, McCue P, Yeo CJ, White MA, DeBerardinis RJ, Knudsen ES, Witkiewicz AK. MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell Rep* 2014; 9: 2233-49.

Baker SK, McCullagh KJ, Bonen A. Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. *J Appl Physiol (1985)* 1998; 84: 987-94.

Bayer C, Vaupel P. Acute versus chronic hypoxia in tumors: Controversial data

concerning time frames and biological consequences. *Strahlenther Onkol* 2012; 188: 616-27.

Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 2002; 3: 420-5.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 967-75.

Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol* 2001; 86: 6-11.

Boria PA, Murry DJ, Bennett PF, Glickman NW, Snyder PW, Merkel BL, Schlittler DL, Mutsaers AJ, Thomas RM, Knapp DW. Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 388-94.

Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1452-63.

Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 180-92.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996; 56: 941-3.

Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38: 285-9.

Bronden LB, Eriksen T, Kristensen AT. Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs--data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Vet Scand* 2009; 51: 54.

Brooks MB, Matus RE, Leifer CE, Alfieri AA, Patnaik AK. Chemotherapy versus chemotherapy plus radiotherapy in the treatment of tonsillar squamous cell carcinoma in the dog. *J Vet Intern Med* 1988; 2: 206-11.

Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1999; 59: 5863-70.

Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 437-47.

Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 8903-8.

Cairns RA, Hill RP. Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 2054-61.

Candace K, Grier MNM. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. *CVJ* 2007; 48

Cardenas-Navia LI, Mace D, Richardson RA, Wilson DF, Shan S, Dewhirst MW. The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 5812-9.

Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res* 1987; 47: 597-601.

Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol*

Chem 2001; 276: 9519-25.

Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, Dewhirst M, West M, Chi JT. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. PLoS Genet 2008; 4: e1000293.

Choi JW, Kim Y, Lee JH, Kim YS. Prognostic significance of lactate/proton symporters MCT1, MCT4, and their chaperone CD147 expressions in urothelial carcinoma of the bladder. Urology 2014; 84: 245 e9-15.

Curry JM, Tuluc M, Whitaker-Menezes D, Ames JA, Anantharaman A, Butera A, Leiby B, Cagnetti DM, Sotgia F, Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE. Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. Cell Cycle 2013; 12: 1371-84.

Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. Trends Biochem Sci 1999; 24: 68-72.

De Saedeleer CJ, Porporato PE, Copetti T, Perez-Escuredo J, Payen VL, Brisson L, Feron O, Sonveaux P. Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration. Oncogene 2014; 33: 4060-8.

Denekamp J, Fowler JF. ARCON--current status: summary of a workshop on preclinical and clinical studies. Acta Oncol 1997; 36: 517-25.

Deuticke B. Monocarboxylate transport in red blood cells: kinetics and chemical modification. Methods Enzymol 1989; 173: 300-29.

Dewhirst MW, Kimura H, Rehms SW, Braun RD, Papahadjopoulos D, Hong K, Secomb TW. Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia. Br J Cancer Suppl 1996; 27: S247-51.

Dewhirst MW. Mechanisms underlying hypoxia development in tumors. *Adv Exp Med Biol* 2003; 510: 51-6.

Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 2000; 350 Pt 1: 219-27.

Doleschel D, Rix A, Arns S, Palmowski K, Gremse F, Merkle R, Salopiata F, Klingmüller U, Jarsch M, Kiessling F, Lederle W. Erythropoietin improves the accumulation and therapeutic effects of carboplatin by enhancing tumor vascularization and perfusion. *Theranostics* 2015; 5: 905-18.

Dorn CR, Taylor DO, Frye FL, Hibbard HH. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst* 1968a; 40: 295-305.

Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 1968b; 40: 307-18.

Dorn CR, Priester WA. Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs, cats, horses, and cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169: 1202-6.

Dubouchaud H, Granier P, Mercier J, Le Peuch C, Prefaut C. Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 80: 416-21.

Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC, Brooks GA. Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E571-9.

Durand RE, LePard NE. Contribution of transient blood flow to tumour hypoxia

in mice. *Acta Oncol* 1995; 34: 317-23.

Enerson BE, Drewes LR. Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J Pharm Sci* 2003; 92: 1531-44.

Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2006; 577: 433-43.

Fanelli A, Grollman EF, Wang D, Philp NJ. MCT1 and its accessory protein CD147 are differentially regulated by TSH in rat thyroid cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1223-9.

Fang J, Quinones QJ, Holman TL, Morowitz MJ, Wang Q, Zhao H, Sivo F, Maris JM, Wahl ML. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 2108-15.

Fei F, Guo X, Chen Y, Liu X, Tu J, Xing J, Chen Z, Ji J, He X. Polymorphisms of monocarboxylate transporter genes are associated with clinical outcomes in patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141: 1095-102.

Fisel P, Stuhler V, Bedke J, Winter S, Rausch S, Hennenlotter J, Nies AT, Stenzl A, Scharpf M, Fend F, Kruck S, Schwab M, Schaeffeler E. MCT4 surpasses the prognostic relevance of the ancillary protein CD147 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2015;

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-6.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-

inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-13.

Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 2003; 278: 40128-35.

Fruehauf JP, Meyskens FL, Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 2007; 13: 789-94.

Fulton AJ, Nemec A, Murphy BG, Kass PH, Verstraete FJ. Risk factors associated with survival in dogs with nontonsillar oral squamous cell carcinoma 31 cases (1990-2010). *J Am Vet Med Assoc* 2013; 243: 696-702.

Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res* 2007; 67: 4182-9.

Gallagher SM, Castorino JJ, Philp NJ. Interaction of monocarboxylate transporter 4 with beta1-integrin and its role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296: C414-21.

Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 1994; 76: 865-73.

Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 14: 831-8.

Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 646-53.

Ghisleni G, Roccabianca P, Ceruti R, Stefanello D, Bertazzolo W, Bonfanti U, Caniatti M. Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 24-30.

Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 2008; 49 Suppl 2: 24S-42S.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.

Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26: 638-48.

Guo X, Chen C, Liu B, Wu Y, Chen Y, Zhou X, Huang X, Li X, Yang H, Chen Z, Xing J. Genetic variations in monocarboxylate transporter genes as predictors of clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 3931-9.

Gurrapu S, Jonnalagadda SK, Alam MA, Nelson GL, Sneve MG, Drewes LR, Mereddy VR. Monocarboxylate transporter 1 inhibitors as potential anticancer agents. *ACS Med Chem Lett* 2015; 6: 558-61.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; 343 Pt 2: 281-99.

Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; 447: 619-28.

Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 2012; 64: 109-19.

Hall EJ. Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 1-7.

Hanson DJ, Nakamura S, Amachi R, Hiasa M, Oda A, Tsuji D, Itoh K, Harada T, Horikawa K, Teramachi J, Miki H, Matsumoto T, Abe M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of monocarboxylate transportation. *Oncotarget* 2015;

Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.

Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J* 2007; 21: 2602-12.

Ho J, de Moura MB, Lin Y, Vincent G, Thorne S, Duncan LM, Hui-Min L, Kirkwood JM, Becker D, Van Houten B, Moschos SJ. Importance of glycolysis and oxidative phosphorylation in advanced melanoma. *Mol Cancer* 2012; 11: 76.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996; 56: 4509-15.

Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-76.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3551-5.

Howard C, Reed M (2005) *Unbiased Stereology*. QTP Publications, Coleraine, UK

Hoyt R, Withrow S. Oral malignancy in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20: 83-92.

Hsieh CH, Lee CH, Liang JA, Yu CY, Shyu WC. Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. *Oncol Rep* 2010; 24: 1629-36.

Ito Y, Kamijo T, Yokose T, Kawashima M, Ogino T, Ikeda H, Hayashi R, Sasaki S, Ochiai A. Microvessel density predicts the radiosensitivity of metastatic head and neck squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes. *Int J Oncol* 2001; 19: 1127-32.

Jordan BF, Sonveaux P. Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Front Pharmacol* 2012; 3: 94.

Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM, Frantz GD, Peale FV, Wu TD, Koeppen HW, Hillan KJ. Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1alpha, and carbonic anhydrase IX in human tumours. *J Clin Pathol* 2004; 57: 504-12.

Kaanders JH, Bussink J, van der Kogel AJ. ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *Lancet Oncol* 2002; 3: 728-37.

Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008; 30: 393-402.

Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999; 11: 1-14.

Kambayashi S, Igase M, Kobayashi K, Kimura A, Shimokawa-Miyama T, Baba K, Noguchi S, Mizuno T, Okuda M. Hypoxia inducible factor 1alpha expression and effects of its inhibitors in canine lymphoma. *J Vet Med Sci* 2015;

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1469-80.

Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol* 2010; 6: 127-48.

Kessler M, Kühnel S. Chirurgische Therapie oraler Plattenepithelkarzinome beim Hund – eine retrospektive Untersuchung bei 40 Patienten. In: „Kleintiermedizin 2011 – Fortschritte, Evidenz, Visionen“ Berlin: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) 2011;

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3: 177-85.

Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS. Expression of lactate/H(+) symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell renal cell carcinoma: immunohistochemical and The Cancer Genome Atlas data analyses. *Hum Pathol* 2015; 46: 104-12.

Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, Hong K, Dewhirst MW. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res* 1996; 56: 5522-8.

Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 2000; 19: 3896-904.

Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 2008; 15: 660-6.

Kocher M, Treuer H. Reoxygenation of hypoxic cells by tumor shrinkage during irradiation. A computer simulation. *Strahlenther Onkol* 1995; 171: 219-30.

Kondoh M, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Maishi N, Towfik AM, Inoue N, Shindoh M, Hida K. Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment. *PLoS One* 2013; 8: e80349.

Konerding MA, Steinberg F, Streffer C. The vasculature of xenotransplanted human melanomas and sarcomas on nude mice. I. Vascular corrosion casting studies. *Acta Anat (Basel)* 1989a; 136: 21-6.

Konerding MA, Steinberg F, Streffer C. The vasculature of xenotransplanted human melanomas and sarcomas on nude mice. II. Scanning and transmission electron microscopic studies. *Acta Anat (Basel)* 1989b; 136: 27-33.

Kosovsky JK, Matthiesen DT, Marretta SM, Patnaik AK. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Vet Surg* 1991; 20: 397-401.

Ladanyi M, Antonescu CR, Drobnjak M, Baren A, Lui MY, Golde DW, Cordon-Cardo C. The precrystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147. *Am J Pathol* 2002; 160: 1215-21.

LaDue-Miller T, Price GS, Page RL, Thrall DE (1996) **RADIOTHERAPY OF CANINE NON-TONSILLAR SQUAMOUS CELL CARCINOMA** *Veterinary Radiology & Ultrasound* Volume 37, Issue 1. In: *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 74-7

Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Levy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B, Batteux F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005; 65: 948-56.

Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001; 61: 6394-9.

Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Macias-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sanchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 2006; 273: 1975-88.

Martinive P, Defresne F, Bouzin C, Saliez J, Lair F, Gregoire V, Michiels C, Dessy C, Feron O. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res* 2006; 66: 11736-44.

Mathupala SP, Parajuli P, Sloan AE. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery* 2004; 55: 1410-9; discussion 9.

Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8104-9.

McCaw DL, Pope ER, Payne JT, West MK, Thompson RV, Tate D. Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2000; 82: 1297-9.

McCullagh KJ, Juel C, O'Brien M, Bonen A. Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1996; 156: 51-7.

Meijer TW, Schuurbiers OC, Kaanders JH, Looijen-Salamon MG, de Geus-Oei LF, Verhagen AF, Lok J, van der Heijden HF, Rademakers SE, Span PN, Bussink J. Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer* 2012; 76: 316-23.

Meredith D, Christian HC. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* 2008; 38: 1072-106.

Metwally MA, Frederiksen KD, Overgaard J. Compliance and toxicity of the hypoxic radiosensitizer nimorazole in the treatment of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Acta Oncol* 2014; 53: 654-61.

Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Goncalves V, Moreira AH, Queiros S, Vilaca JL, Schmitt FC, Longatto-Filho A, Paredes J, Baltazar F, Pinheiro C. Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth. *Oncotarget* 2015; 6: 19177-89.

Murphy S, Hayes A, Adams V, Maglennon G, Neath P, Ladlow J, Brearley MJ. Role of carboplatin in multi-modality treatment of canine tonsillar squamous cell carcinoma--a case series of five dogs. *J Small Anim Pract* 2006; 47: 216-20.

Nakayama Y, Torigoe T, Inoue Y, Minagawa N, Izumi H, Kohno K, Yamaguchi K. Prognostic significance of monocarboxylate transporter 4 expression in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med* 2012; 3: 25-30.

Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White E. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev* 2004; 18: 2095-107.

Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2: 213-9.

Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 2005; 77: 18-24.

Overgaard J. Clinical evaluation of nitroimidazoles as modifiers of hypoxia in solid tumors. *Oncol Res* 1994; 6: 509-18.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006; 3: 187-97.

Pertega-Gomes N, Vizcaino JR, Miranda-Goncalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, Monteiro P, Henrique RM, Reis RM, Lopes C, Baltazar F. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* 2011; 11: 312.

Pestili de Almeida EM, Piche C, Sirois J, Dore M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 867-75.

Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 2005; 94: 1-14.

Pilegaard H, Terzis G, Halestrap A, Juel C. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: E843-8.

Pinheiro C, Longatto-Filho A, Ferreira L, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jube LF, Queiroz GS, Schmitt F, Baltazar F. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2008a; 27: 568-74.

Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, Rodrigues M, Alves VA, Schmitt F, Baltazar F. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 2008b; 452: 139-46.

Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993; 264: C761-82.

Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, Bussink J, Kaanders JH. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1alpha, CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer* 2011; 11: 167.

Raleigh JA, Chou SC, Arteel GE, Horsman MR. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat Res* 1999; 151: 580-9.

Reinhold HS, Blachiewicz B, Blok A. Oxygenation and reoxygenation in 'sandwich' tumours. *Bibl Anat* 1977: 270-2.

Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 1996; 56: 5754-7.

Rohrer Bley C, Luluhova D, Roos M, Kaser-Hotz B, Ohlerth S. Correlation of pretreatment polarographically measured oxygen pressures with quantified contrast-enhanced power doppler ultrasonography in spontaneous canine tumors and their impact on outcome after radiation therapy. *Strahlenther Onkol* 2009; 185: 756-62.

Rossi L, Boccardo F, Corvo R. Endothelial cells increase the radiosensitivity of oropharyngeal squamous carcinoma cells in collagen gel. *Oral Oncol* 2004; 40: 214-22.

Rowinsky EK. Novel radiation sensitizers targeting tissue hypoxia. *Oncology* (Williston Park) 1999; 13: 61-70.

Royet JP. Stereology: a method for analyzing images. *Prog Neurobiol* 1991; 37: 433-74.

Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* 2009; 107: 1053-62.

Rudat V, Stadler P, Becker A, Vanselow B, Dietz A, Wannenmacher M, Molls M, Dunst J, Feldmann HJ. Predictive value of the tumor oxygenation by means of pO₂ histography in patients with advanced head and neck cancer. *Strahlenther Onkol* 2001; 177: 462-8.

Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1783-6.

Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3436-44.

Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5680-4.

Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 32529-37.

Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 71-103.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.

Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest* 2008; 118: 3835-7.

Shi H, Jiang H, Wang L, Cao Y, Liu P, Xu X, Wang Y, Sun L, Niu H. Overexpression of monocarboxylate anion transporter 1 and 4 in T24-induced cancer-associated fibroblasts regulates the progression of bladder cancer cells in a 3D microfluidic device. *Cell Cycle* 2015: 1-8.

Shimoyama Y, Akihara Y, Kirat D, Iwano H, Hirayama K, Kagawa Y, Ohmachi T, Matsuda K, Okamoto M, Kadosawa T, Yokota H, Taniyama H. Expression of monocarboxylate transporter 1 in oral and ocular canine melanocytic tumors. *Vet Pathol* 2007; 44: 449-57.

Shin JI, Lim HY, Kim HW, Seung BJ, Sur JH. Analysis of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression Relative to Other Key Factors in Malignant Canine Mammary Tumours. *J Comp Pathol* 2015; 153: 101-10.

Snyder SA, Dewhirst MW, Hauck ML. The role of hypoxia in canine cancer. *Vet Comp Oncol* 2008; 6: 213-23.

Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3930-42.

Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Vegran F, Verrax J, Kennedy KM, Moon EJ, Dhup S, Danhier P, Frerart F, Gallez B, Ribeiro A, Michiels C, Dewhirst MW, Feron O. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* 2012; 7: e33418.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005; 10: 1881-96.

Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999; 274: 24142-6.

Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 1981; 41: 73-81.

Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 139-68.

Theon AP, Rodriguez C, Madewell BR. Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 778-84.

Thews O, Wolloscheck T, Dillenburg W, Kraus S, Kelleher DK, Konerding MA, Vaupel P. Microenvironmental adaptation of experimental tumours to chronic vs acute hypoxia. *Br J Cancer* 2004; 91: 1181-9.

Thomlinson R, Gray L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539.

Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175: 567-71.

Trotter MJ, Chaplin DJ, Olive PL. Possible mechanisms for intermittent blood flow in the murine SCCVII carcinoma. *Int J Radiat Biol* 1991; 60: 139-46.

Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-

dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281: 9030-7.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449-65.

Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18: 243-59.

Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 10-7.

Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 225-39.

Vaupel PW. The influence of tumor blood flow and microenvironmental factors on the efficacy of radiation, drugs and localized hyperthermia. *Klin Padiatr* 1997; 209: 243-9.

Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol* 2003; 179: 801-11.

Vos JH, van der Gaag I. Canine and feline oral-pharyngeal tumours. *Zentralbl Veterinarmed A* 1987; 34: 420-7.

Wallace J, Matthiesen DT, Patnaik AK. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Vet Surg* 1992; 21: 337-41.

Walsh JC, Lebedev A, Aten E, Madsen K, Marciano L, Kolb HC. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 1516-54.

Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 4304-8.

Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 1927; 8: 519-30.

Warburg OH (1926) über den Stoffwechsel der Tumoren. J. Springer

Weibel ER (1979) *Stereological Methods*. Academic Press, London, New York

Wergin MC, Kennedy K, Geradts J, Schroeder T, Sonveaux P, Feron O, Brizel DM, Dewhirst MW. MCT1 vs. MCT4 expression patterns in tumors: Potential Markers of Cycling Hypoxia. *Clin Canc Res*, in Review 2015;

Wilson MC, Jackson VN, Heddle C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF, Halestrap AP. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J Biol Chem* 1998; 273: 15920-6.

Wu R, Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IV. Pasteur effect and Crabtree effect in ascites tumor cells. *J Biol Chem* 1959; 234: 1036-41.

Yan C, Yang F, Zhou C, Chen X, Han X, Liu X, Ma H, Zheng W. MCT1 promotes the cisplatin-resistance by antagonizing Fas in epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 2710-8.

Yuan G, Adhikary G, McCormick AA, Holcroft JJ, Kumar GK, Prabhakar NR. Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J Physiol* 2004; 557: 773-83.

Zhang C, Cao S, Toole BP, Xu Y. Cancer may be a pathway to cell survival under persistent hypoxia and elevated ROS: a model for solid-cancer initiation and early

development. *Int J Cancer* 2015; 136: 2001-11.

Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; 283: 10892-903.

Zhao Z, Wu MS, Zou C, Tang Q, Lu J, Liu D, Wu Y, Yin J, Xie X, Shen J, Kang T, Wang J. Downregulation of MCT1 inhibits tumor growth, metastasis and enhances chemotherapeutic efficacy in osteosarcoma through regulation of the NF-kappaB pathway. *Cancer Lett* 2014; 342: 150-8.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5.

IX. ANHANG

1. HE-Färbung

Xylol	3 x je 2 Minuten, RT
Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 5 Minuten, RT
Aqua dest.	5 Minuten, RT
Hämatoxylin	3 x je 2 Minuten, RT
Bläuen unter laufendem Leitungswasser	5 bis 10 Minuten
Eosin	1 bis 1,5 Minuten, RT
Alkoholreihe aufsteigend (1 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %)	je 2 Minute, RT
Xylol	2 x je 5 Minuten, RT
Eindecken	

2. IHC Zytokeratin

Xylol	3 x je 5 Minuten, RT
Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 5 Minuten, RT
Aqua dest.	5 Minuten, RT
10 mM Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle (nach 5 Minuten bei 800 Watt auf 200 Watt umstellen)	25 Minuten
in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 belassen	20 Minuten, RT
Aqua dest.	10 Minuten, RT
H ₂ O ₂ 1 % in Methanol	15 Minuten, RT, im Abzug
PBS	5 Minuten, RT
Horse Serum (Immpress)	20 Minuten , RT, in der Feuchtkammer
Primärantikörper Zytokeratin (1:1000 in PBS)	über Nacht, bei 4°C, in der Feuchtkammer
PBS	5 Minuten, RT
Sekundärantikörper Horse Anti-Mouse (Immpress)	30 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
PBS	5 Minuten, RT
DAB	5 bis 10 Minuten, RT, im Abzug
Hämalaun	20 Sekunden, RT
Bläuen (unter laufendem Leitungswasser)	5 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Alkoholreihe aufsteigend (1x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %)	je 1 Minute, RT

Xylol	2 x je 3 Minuten, 1 x 5 Minuten, RT
Eindecken	

3. IHC MCT1/4

3.1. Protokoll Einzel-IHC zum Nachweis von MCT1 oder MCT4

Xylol	3 x je 5 Minuten, RT
Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 5 Minuten, RT
Aqua dest.	5 Minuten, RT
H ₂ O ₂ 30%ig in Methanol, Verhältnis 1:9	20 Minuten, RT, im Abzug
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
Horse Serum (Impress)	30 Minuten , RT, in der Feuchtkammer
Primärantikörper MCT 1 (1:200 in PBS mit 2% FCS) oder MCT4 (1:300 in PBS mit 2% FC)	über Nacht, bei 4°C, in der Feuchtkammer
Primärantikörper MCT 1 (1:200 in PBS mit 2% FCS) oder MCT4 (1:300 in PBS mit 2% FC)	60 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
Sekundärantikörper Horse Anti-Rabbit (Immpress)	30 Minuten, RT
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
DAB	5 bis 10 Minuten, RT, im Abzug
Aqua dest.	5 Minuten, RT
Hämalaun	20 Sekunden, RT
Bläuen (unter laufendem Leitungswasser)	5 bis 10 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Alkoholreihe aufsteigend (1x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %)	je 3 Minuten, RT
Xylol	3 x je 3 Minuten, RT

Eindecken	
-----------	--

3.2. Protokoll Doppel-IHC zum Nachweis von MCT1 und MCT4

Xylol	3 x je 5 Minuten, RT
Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 5 Minuten, RT
Aqua dest.	5 Minuten, RT
H ₂ O ₂ 30%ig in Methanol, Verhältnis 1:9	20 Minuten, RT, im Abzug
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
Horse Serum (Impress)	30 Minuten , RT, in der Feuchtkammer
Primärantikörper MCT 1 (1:200 in PBS mit 2% FCS)	über Nacht, bei 4°C, in der Feuchtkammer
Primärantikörper MCT 1 (1:200 in PBS mit 2% FCS)	60 Minuten , RT, in der Feuchtkammer
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
Sekundärantikörper Horse Anti-Rabbit (Immpress)	30 Minuten, RT
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
DAB	5 bis 10 Minuten, RT, im Abzug
Aqua dest.	5 Minuten, RT
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
LinBlock	2 Minuten, RT
Aqua dest.	1 Minute, RT
LinBlock	2 Minuten, RT
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT

Primärantikörper MCT 4 (1:300 in PBS mit 2% FCS)	über Nacht, bei 4°C, in der Feuchtkammer
Primärantikörper MCT 4 (1:300 in PBS mit 2% FCS)	60 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
Sekundärantikörper Horse Anti-Rabbit (Immpress)	30 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 Minuten, RT
Histogreen	5 Minuten, RT
Aqua dest.	5 Minuten, RT
Hämalaun	20 Sekunden, RT
Bläuen (unter laufendem Leitungswasser)	5 bis 10 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Alkoholreihe aufsteigend (1x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %)	je 3 Minuten, RT
Xylol	3 x je 3 Minuten, RT
Eindecken	

4. IHC von Willebrand Faktor

Xylol	2 x je 5 Minuten, 1 x 10 Minuten, RT
Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 5 Minuten, RT
Aqua dest.	5 Minuten, RT
Proteinase K RTU	20 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
PBS	2 x je 5 Minuten, RT
H ₂ O ₂ 1 % in Methanol	30 Minuten, RT, im Abzug
PBS	2 x je 5 Minuten, RT
Horse Serum (Impress)	20 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
Primärantikörper Von Willebrand Faktor (1:1000 in PBS)	über Nacht, bei 4°C, in der Feuchtkammer
PBS	3 x je 5 Minuten, RT
Sekundärantikörper Horse Anti-Rabbit (Immpress)	30 Minuten, RT, in der Feuchtkammer
PBS	3 x je 5 Minuten, RT
NovaRED	5 Minuten, RT
Hämalaun	15 Sekunden, RT
Bläuen (unter laufendem Leitungswasser)	5 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Alkoholreihe aufsteigend (1x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %)	je 3 Minuten, RT
Xylol	3 x je 3 Minuten, RT

Eindecken	
-----------	--

X. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Johannes Hirschberger, ganz herzlich für die Unterstützung und Betreuung während der gesamten Zeit als Doktorandin und die lehrreichen Jahre in der klinischen Onkologie bedanken.

In besonderem Maße danke ich auch meiner Betreuerin Frau Dr. Melanie Wergin, die mir dieses spannende Thema anvertraut hat und unter deren herausragender fachlicher Betreuung ich dieses interessante Projekt ausarbeiten durfte.

Herrn Dr. Wolf von Bomhard und seinen Mitarbeitern gilt mein außerordentlicher Dank für die Bereitstellung und Vorbereitung des histologischen Probenmaterials.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiasek sehr für die fachliche Unterstützung bei der Umsetzung des Projektes und dem gesamten Team der Neuropathologie-Abteilung, allen voran Frau Karin Stingl, die mich während der immunhistochemischen Analysen sehr geduldig begleitet hat.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Andreas Blutke für die kompetente Betreuung der quantitativ-morphologischen Auswertung und seine hilfreichen Korrekturen des Manuskripts. Er stand mir zu jeder Zeit unterstützend und geduldig, mit viel Verständnis und einer unerschöpflichen Motivation zur Seite.

Ich möchte mich auch ganz herzlich beim gesamten Team der Abteilung für Onkologie der Medizinischen Kleintierklinik für die schöne, lehrreiche, amüsante und sicherlich unvergessliche Doktorandenzeit bedanken.

Danke an alle Freunde und Kollegen, die durch fleißige Korrekturarbeiten, motivierenden Zuspruch und wertvolle Ratschläge zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Katrin, Miri, Camille, Steffi, Kasia, Franzl und Franzl erwähnen.

Von ganzem Herzen danke ich Bernd, dass er sich immer für mich eingesetzt hat und auch in schwierigen Situationen mein Ruhepol war.

Zuletzt möchte ich in tiefer Dankbarkeit meine Eltern nennen, die mir in liebevoller Unterstützung nicht nur das Tiermedizinstudium, sondern auch diese Dissertation ermöglicht haben.